

Zum Stoffwechsel der Barbiturate
insbesondere der
Cycloheptenyl-Aethyl-Barbitursaeure

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

MARCEL H. BICKEL

aus Adliswil (Zürich)



Zentral-Verlag für Dissertationen Triltsch Düsseldorf

1960

1959

Zum Stoffwechsel der Barbiturate
insbesondere der
Cycloheptenyl-Aethyl-Barbitursaeure

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel
von
MARCEL H. BICKEL
aus Adliswil (Zürich)



Zentral-Verlag für Dissertationen Triltsch Düsseldorf

1960

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf
Antrag der Herren Professoren
Dr. K. Bernhard und Dr. T. Reichstein

Basel, den 20. Februar 1959

Prof. Dr. Rudolf Geigy
Dekan



*Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546712_0099

Herrn Prof. Dr. Karl Bernhard, auf dessen Veranlassung die vorliegende Arbeit entstand, möchte ich an dieser Stelle für seine Unterstützung und Förderung danken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	7
Barbiturate	9
Methoden zur Aufklärung des Barbiturat-Stoffwechsels	11
Verteilung der Barbiturate im Organismus	12
Metabolismus der Barbiturate	13
Zur Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure	20
II. Synthese von ^{14}C -Signierter 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure . .	21
A) Theoretischer Teil	21
B) Experimenteller Teil	27
1. Modellversuche mit inaktivem Material	27
2. Synthese von 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure mit ^{14}C - Signierung in Stellung 5	27
III. Ausscheidung und Verteilung von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure im Organismus	31
A) Ausscheidung und Verteilung nach 15 Stunden	31
Methode, Ergebnisse, Diskussion, Experimentelles	
B) Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung innerhalb 10 Tagen	37
Methode, Ergebnisse, Diskussion, Experimentelles	
C) Ausscheidung mit der Galle	41
Methode, Ergebnisse, Diskussion, Experimentelles	
IV. Metabolismus der Cycloheptenyl-äthyl-Barbitursäure	45
A) Ergebnisse und Diskussion	45
1. Verteilung der Metaboliten in Harn, Galle, Faeces	45
2. Metabolit I	48
3. Metabolit II	54
4. Metaboliten III und IV	57
B) Experimentelles	57
Zusammenfassung	60
Literaturverzeichnis	61

I. EINLEITUNG

Die vorliegende Untersuchung über das Schicksal der als Schlafmittel verwendeten Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure*) im Organismus bilden einen Beitrag zur Kenntnis des Barbiturat-Stoffwechsels.

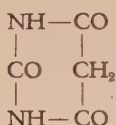
Der Forschung auf dem Gebiete des Medikamentenstoffwechsels standen lange Zeit beträchtliche methodische Schwierigkeiten entgegen. Sie liegen vor allem in den meist nur sehr kleinen, dem Körper als Pharmaka zuführbaren Substanzmengen, für deren Ermittlung in Geweben, Körperflüssigkeiten und Exkreten die konventionellen analytischen Methoden oft versagen. Erst die letzten zehn Jahre haben dem Biochemiker und Pharmakologen Mittel und Methoden in die Hand gegeben, welche eine Erforschung des Medikamentenstoffwechsels auf breiterer Basis und mit wesentlich größerer Genauigkeit erlauben.

Derartige Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich Menge und Geschwindigkeit der Ausscheidung, allfälliger Retentionen und Akkumulationen sowie der Art und Eigenschaften der Metaboliten, sind nicht nur von pharmakologischer und physiologischer, sondern auch sozialhygienischer Bedeutung. Insbesondere gilt dies von Mitteln wie den Analgetica und Hypnotica, welche heute in gewaltigen Mengen verbraucht werden.

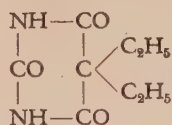
*) MEDOMIN, Schutzmarke der J. R. Geigy A. G.

Barbiturate

Unter den Hypnotica nehmen trotz Konkurrenzierung durch neuere Produkte die disubstituierten Barbitursäuren noch immer die erste Stelle ein. Sie wurden nach den Forschungen von *Emil Fischer* und *J. v. Mehring*¹ und der daraus resultierenden Entdeckung der Diäthyl-barbitursäure (Veronal, Barbitalum) im Jahre 1903 in die Therapie eingeführt und bildeten einen grossen Fortschritt gegenüber den älteren, oft nicht unbedenklichen Schlafmitteln.



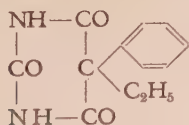
Barbitursäure
(kein Schlafmittel)



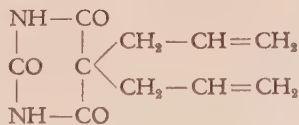
Veronal

1912 schuf *E. Impens*² die Phenyl-äthyl-barbitursäure, welche unter dem Namen Phenobarbital oder Luminal ebenfalls grosse Verbreitung fand.

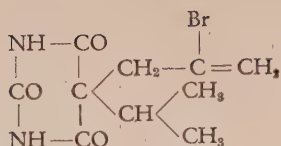
Die Nachteile dieser beiden Produkte bilden ihre protrahierte und post-hypnotische Wirkung und ihre behauptete Akkumulation im Organismus. Die weitere Entwicklung geschah daher nach den Gesichtspunkten des raschen Wirkungseintrittes, der Erzeugung einer normalen Schlafdauer und der raschen Ausscheidung oder Entgiftung durch den Körper. Diesen Forderungen näher kam 1914 die Diallyl-barbitursäure (Dial), 1927 die 5-(2-Bromallyl)-5-isopropyl-barbitursäure (Propallylomal, Nostal) und in der Folge eine sehr grosse Anzahl von 5,5-Barbituraten mit variierenden Substituenten und deren Kombinationen. Beispiele dafür sind etwa s-Butyl-äthyl-barbitursäure (Butabarbital), 1-Methylbutyl-äthyl-barbitursäure (Pentobarbital), 1-Methylbutyl-allyl-barbitursäure (Seconal).



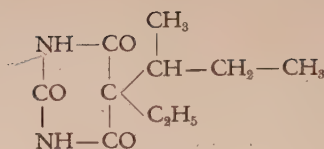
Phenobarbital
Luminal



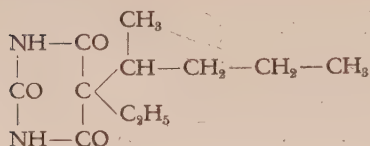
Dial



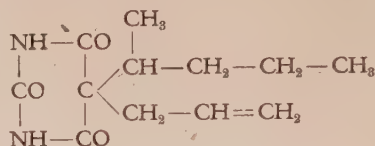
Nostal



Butabarbital

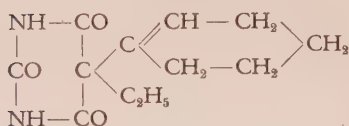


Pentobarbital

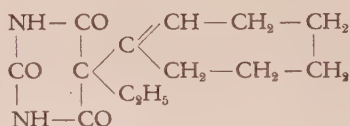


Seconal

Einen entscheidenden Schritt in Richtung auf optimale Schlafmitteleigenschaften bildete die Einführung von Cycloalkenylresten in die 5-Stellung der Barbitursäure. Das erste derartige Hypnoticum war die 1924 von *Impens*³ entwickelte 5,5-Cyclohexen(1)-yl-äthyl-barbitursäure, die unter dem Namen *Phanodorm* (Cyclo-barbitalum) auf den Markt gebracht wurde. Eine verbesserte⁴ Variation davon bildet die 1942 in die Therapie eingeführte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure (*Medomin*).

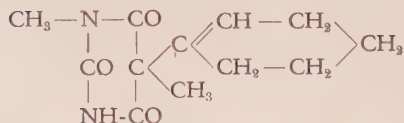


Phanodorm

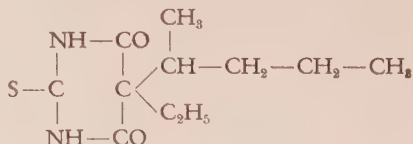


Medomin

Parallel zu dieser Entwicklung ging diejenige der N-alkylierten und der 2-Thiobarbiturate, welche besonders als kurzwirksame Einschlafmittel oder, bei intravenöser Applikation, als Narcotica geeignet sind. Beispiele sind *Evipan* (Hexobarbital) und *Thiopental* (Pentothal).



Evipan



Thiopental

Der heutige Arzneimittelschatz verfügt über sehr zahlreiche als Hypnotica und Sedativa verwendete substituierte Barbitursäuren sowie geeignete Kombinationspräparate.

Methoden zur Aufklärung des Barbiturat-Stoffwechsels

Bemühungen um Einblick in den Metabolismus der Barbiturate wurden schon von Anfang an beim Veronal⁵ unternommen. Das Hauptinteresse an toxikologischen und chemischen Bestimmungsmethoden von Barbituraten in Exkreten, Blut und Geweben kam vor allem von Seiten der forensischen Medizin (Suicidproblem). Wie schon erwähnt, war die Verlässlichkeit der Methoden, insbesondere für quantitative Bestimmungen, bis Ende der Vierzigerjahre sehr begrenzt. Die Methoden litten an zu geringer Spezifität und Empfindlichkeit.

Die gravimetrische Methode war die zuerst angewandte. Sie besteht in der Extraktion der Barbiturate oder ihrer Metaboliten aus Exkreten, Geweben oder Körperflüssigkeiten mit Hilfe organischer Lösungsmittel und anschließender Isolierung aus dem Extrakt. Diese Methode ist weder spezifisch noch empfindlich. Die Verluste bei Extraktion, Isolierung und Reinigung sind bedeutend und führen nur bei Harnextraktionen zu einigermaßen brauchbaren Resultaten.

Verbesserung brachte die Einführung der colorimetrischen Methoden, insbesondere der Zwikker'schen Farbreaktion mit Cobaltnitrat. Dies ermöglichte den qualitativen Nachweis von Barbituraten in den konzentrationsschwachen Blut- und Gewebsextrakten.

Die Tatsache, dass alle Barbiturate eine charakteristische Absorption im ultravioletten Teil des Spektrums aufweisen, führte 1941 zur Entwicklung der UV-spektrophotometrischen Methode. Sie ist ziemlich empfindlich, jedoch nicht ganz spezifisch. Neure Arbeitsvorschriften geben vor allem Goldbaum⁶ und Broughton⁷.

Die pharmakologische Methode beschränkt sich auf die Prüfung von isolierten Barbituraten, Metaboliten oder Rohextrakten auf ihre hypnotische oder toxische Wirkung. Sie ist eher als Hilfsmittel zur Unterscheidung denn als Bestimmungsmethode zu gebrauchen.

Unter den neuesten Methoden muss an erster Stelle die Isotopen-signierung genannt werden, die gerade auf dem Gebiete des Medikamentenstoffwechsels einen entscheidenden Fortschritt darstellt und Probleme zu lösen erlaubt, die allen früheren Methoden unerreichbar sein mussten. Das Prinzip besteht in der synthetischen Einführung von Isotopen in das Barbiturat-molekül und der dadurch gegebenen leichten Nachweisbarkeit durch seine besonderen physikalischen Eigenschaften (Masse, Strahlung). Die Methode ist sowohl sehr empfindlich als auch spezifisch und gestattet z. B. auch den Nachweis von Metaboliten, die mit normalen Stoffwechselprodukten identisch sind. – Die sogenannte Isotopenverdünnungsmethode liefert zudem ein ausgezeichnetes Mittel zur quantitativen Erfassung einzelner Metaboliten.

Unter Verwendung des schweren Stickstoff-Isotopen ¹⁵N untersuchten H. B. von Dyke⁸ und E. W. Maynert^{9,10} den Metabolismus von Pentobarbital, letzterer zudem die Verteilung von Veronal im Gehirn^{11,12}.

Zur Signierung viel geeigneter als ^{15}N ist das Kohlenstoff-Isotop ^{14}C , welches durch Bestimmung der Radioaktivität nachgewiesen werden kann. Auf dem Gebiete der Barbiturate wurde diese Untersuchungsmethode erstmals 1949 angewandt. Sie beschränkte sich bisher auf Untersuchungen an Pentobarbital durch *Roth et al.*¹³, *Kahn*¹⁴, *Titus* und *Weiss*¹⁵, sowie an Veronal durch *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶.

Thiobarbiturate wurden auch mit radioaktivem ^{35}S signiert.

Eine weitere heute unentbehrliche Methode bildet die Papierchromatographie. Sie gestattet den Nachweis kleinster Mengen und bietet Trennungsmöglichkeiten von unter sich nur wenig verschiedenen Metaboliten. Für Barbiturate bietet die neuere Literatur eine ganze Anzahl geeigneter Arbeitsvorschriften^{17–23a}.

Besonders wirkungsvoll ist die Kombination dieser Methode mit der Isotopensignierung. Auf den durch Auftragen radioaktiver Exkrete oder Extrakte erhaltenen Radiochromatogrammen kann sowohl Lage als auch Stärke der Strahlung gemessen werden, was sehr wesentliche Rückschlüsse erlaubt. Diese Methode machten sich *Roth et al.*¹³, *Titus et al.*¹⁵ und *Goldschmidt et al.*¹⁶ in ihren Untersuchungen zunutze. – Die Kombination von Papierchromatographie und Colorimetrie, wie sie etwa von *Pfeil et al.*²⁴ und *Bäumler*²³ ausgearbeitet wurde, kommt vor allem für die Toxikologie in Frage. – Auch Kolonnenchromatographie mit Aluminiumoxyd wurde von *Raventós*²⁵ zur Trennung und Reinigung von Barbituraten verwendet.

Eine für Barbiturate erst seit wenigen Jahren verwendete Methode bildet die kontinuierliche Craig-Verteilung²⁶. Sie ermöglicht Fraktionierung und Anreicherung von in Exkreten oder Extrakten vorhandenen Metaboliten und erlaubt oft erst dadurch deren Isolierung. Diese Methode wurde bisher angewandt von *Titus*¹⁵, *Maynert*²⁷, *Winters*²⁸ bei Untersuchungen an Pentobarbital bzw. Butabarbital und Thiopental.

Verteilung der Barbiturate im Organismus

Ermittlungen von Barbiturat-Konzentration in einzelnen Geweben, Plasma, Liquor oder Körperfett finden sich in der Literatur relativ häufig. Brauchbare Angaben über die Konzentrationen in einer ganzen Anzahl von Organen und Körpergeweben liefern etwa *B. B. Brodie et al.*²⁹ für Pentobarbital, *Goldschmidt et al.*³⁰ für Veronal, *Goldbaum* und *Smith*³¹ darüber hinaus auch für Phenobarbital, Seconal und Thiopental. Umfassende, exakte Verteilungsversuche im Sinne einer Verteilungsbilanz im Organismus scheinen bei Barbituraten noch nicht durchgeführt worden zu sein. Für unsere diesbezüglichen Absichten folgten wir daher den von *K. Bernhard* und Mitarbeitern ausgeführten Verteilungsversuchen an den Hypnotica 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-tetrahydro-pyridin (Persedon), 2,4-Dioxo-3,3-diäthyl-5-methyl-piperidin (Noludar)³² und α -Phenyl- α -äthyl-glutarimid (Doriden)³³.

Metabolismus der Barbiturate

Seit Beginn dieses Jahrhunderts hat sich eine grosse Zahl von Forschern um das Problem der Wirkungsweise und des Stoffwechsels der Barbiturate bemüht. Wenn auch die publizierten Resultate wegen der mangelhaften Methoden oft widersprüchlich und fragwürdig sind, so lässt sich doch aus den fragmentarischen Ergebnissen ein ungefähres Bild über den Metabolismus der Barbiturate ermitteln. Über den Stand der Forschung in den Jahren 1949 und 1954 informieren die Übersichtsreferate von *Maynert* und *van Dyke*³⁴ bzw. von *Raventós*³⁵. Dank der Einführung viel besserer Methoden haben jedoch gerade die letzten Jahre eine wesentliche Erweiterung und Vertiefung unserer Kenntnisse auf dem Gebiete des Barbiturat-Stoffwechsels gebracht. Insbesondere gilt dies von den beiden Arbeiten von *Titus* und *Weiss*¹⁵ sowie von *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶, welchen 1955 bzw. 1957 erstmalig die fast vollständige Aufklärung der metabolischen Veränderungen eines Barbiturates (Pentobarbital bzw. Veronal) gelang. – Für die Stoffwechsel-Untersuchung eines neuen Barbiturates ist die Kenntnis der Ergebnisse anderer Produkte natürlich von Bedeutung, weil sie gewisse wahrscheinliche Möglichkeiten der zu erwartenden metabolischen Veränderungen nahelegen.

Es ist bekannt, dass die (peroral applizierten) Barbiturate im Darme resorbiert werden, in die Blutbahn übergehen und damit zu den spezifischen, im Zentralnervensystem gelegenen Wirkungszentren gelangen. *Butler*³⁶ gelang der Nachweis der Parallelität von Barbiturat-Konzentration im Gehirn und neurologischer Wirkung. Eine eigentliche Speicherung von Barbituraten im Gehirn konnte in keinem Falle nachgewiesen werden. – In einer ersten Phase findet die allgemeine Verteilung des Hypnoticums in den Körperflüssigkeiten und -geweben statt. Nach dieser Verteilungsphase folgt die Eliminationsphase und damit die mehr oder weniger langsame Abnahme der Wirkung.

Die Reaktion des Organismus gegen die körperfremden Barbiturate geschieht vor allem auf drei Weisen:

1. Ablagerung in den Körperlipiden (und damit Fernhaltung von den Wirkungszentren)
2. Chemische Veränderungen (Detoxikationsreaktionen).
3. Renale Ausscheidung.

Alle Barbiturate werden zum grössten Teil durch die Nieren ausgeschieden. Die Unterschiede der einzelnen Hypnotica dieser Klasse liegen in erster Linie in der Geschwindigkeit ihrer Ausscheidung, oder, was im engsten Zusammenhang damit steht, in der Dauer ihrer Wirkung. Nach diesem Gesichtspunkte lassen sich die Barbiturate zwanglos in die drei Gruppen Dauerschlafmittel, Durchschlafmittel und Einschlafmittel einteilen. In den grossen Zügen ist der Zusammenhang zwischen der Wirkungsdauer und der chemischen Konstitution der Barbiturate heute bekannt und bietet folgendes Bild:

Die langwirkenden Dauerschlafmittel sind durchwegs Barbiturate mit aromatischen oder kurzen aliphatischen Substituenten. Als Hauptvertreter sind die Phenyl-äthyl- und die Diäthyl-barbitursäure (Phenobarbital bzw.

Veronal) zu nennen. Die fünf polaren Stellen im Barbitursäurering bedingen eine geringe Affinität zu den Körperlipiden. Zudem zeigt sich, dass diese Produkte biochemisch ziemlich stabil sind. Ein metabolischer Abbau findet nur in geringem Ausmasse statt und die Hypnotica erscheinen zum grössten Teil in unverändertem Zustande im Harn. Diese Ausscheidung erstreckt sich allerdings über längere Zeit (oft Tage), was bedeutet, dass das Pharmakon lange Zeit in Geweben und Blut verweilt und damit eine langfristige, eventuell auch posthypnotische Wirkung am Zentralnervensystem ausübt.

Bei den 5–8 h wirkenden Durchschlafmitteln handelt es sich dagegen um Barbiturate mit längerkettigen aliphatischen oder alicyclischen Substituenten. Beispiele sind Pentobarbital, Phanodorm, Medomin. Bei diesen Substanzen bewirkt der vergrösserte aliphatische Substituent eine gewisse Verschiebung der Affinität zu den Lipiden hin. Wesentlicher ist jedoch die Tatsache, dass diese Barbiturate bei grösserer pharmakologischer Aktivität eine geringere biochemische Stabilität aufweisen als die langwirkenden Produkte. Der Organismus wirkt auf sie im Sinne einer metabolischen Veränderung, die zu Produkten höherer Polarität führt und womit ein doppeltes Resultat erreicht wird: Die pharmakologische Wirkung und die Toxizität der Barbiturate wird vermindert oder aufgehoben (Detoxikation), und ferner wird durch die starke Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit eine rasche renale Ausscheidung möglich. Diese Produkte finden sich im Harne nur noch in geringen Mengen oder gar nicht in unveränderter Form.

Unter die kurzwirkenden sogenannten Einschlafmittel fallen die N-methylierten sowie die Thiobarbiturate. Die Blockierung resp. Depolarisierung der Polaritätszentren des Barbitursäureringes führt zu einem sehr starken Anstieg der Lipidlöslichkeit. Diese Barbiturate lösen sich daher nach kurzer Wirkungszeit in hohem Masse im Körperfett, von wo aus sie langsam zur Ausscheidung gelangen. Auch bei diesen Barbituraten tritt teilweise Metabolisierung ein, doch ist in ihrem Falle die Ablagerung in den Lipiden der massgebende Faktor für die Wirkungsdauer, wie *Brodie* und andere Forscher³⁷ zeigen konnten.

Von biochemischem Interesse sind besonders die metabolischen Veränderungen, denen die Barbiturate im Organismus unterworfen sind. Bis vor etwa fünfzehn Jahren wurde vielfach der weitgehende Abbau in kleine Bruchstücke angenommen. Diese Hypothese rührte nur daher, weil mit den älteren Methoden die Barbiturate oder ihre Metaboliten oft nur zu wenigen Prozenten zurückgewonnen werden konnten und somit für den Rest eine völlige Verbrennung gefordert wurde. Bei den Barbituraten, welche mit den neueren Methoden gründlich untersucht wurden, hat sich diese Hypothese einer radikalen Degradation als völlig unrichtig erwiesen; für die übrigen erscheint sie höchst unwahrscheinlich. Vielmehr sind heute für den Metabolismus der therapeutisch verwendeten 5,5-disubstituierten Barbitursäuren vier Reaktionstypen bekannt:

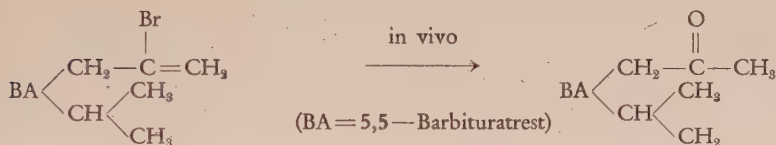
1. Oxydationen in der Seitenkette (Substituent).
2. Bildung von Paarungsprodukten.

3. Spaltung des Barbitursäureringes.

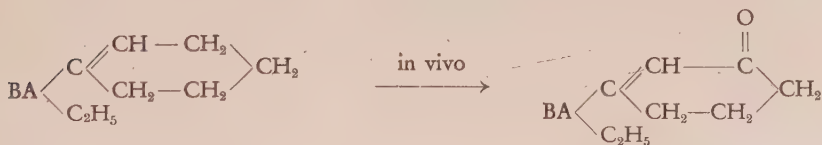
4. 5-Desalkylierung.

1. Seitenkettenoxydationen

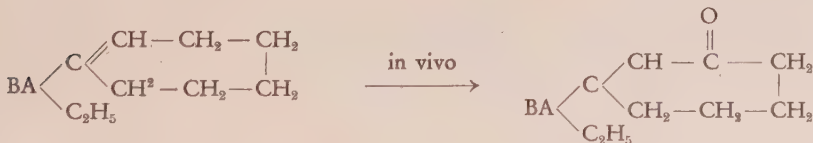
Dieser Reaktionstypus ist zweifellos der wichtigste und führt zu Alkoholen, Ketonen und Carboxylsäuren. Er wurde schon 1927 von *Halberkann* und *Reiche*³⁸ entdeckt am Beispiel der 5-(2-Brom-allyl)-5-isopropyl-barbitursäure, welche oxydativ metabolisiert wird zu Acetonyl-isopropyl-barbitursäure.



1932 gelang *Fretwurst*, *Halberkann* und *Reiche*³⁹ und später *Bush et al.*⁴⁰ nach Verabreichung von Cyclohexenyl-äthyl-barbitursäure die Isolierung von Cyclohexenonyl-äthyl-barbitursäure in etwa 20 %iger Ausbeute neben ca. 10 % unverändertem Hypnoticum. Die Oxydation wird in der 3-Stellung vermutet.

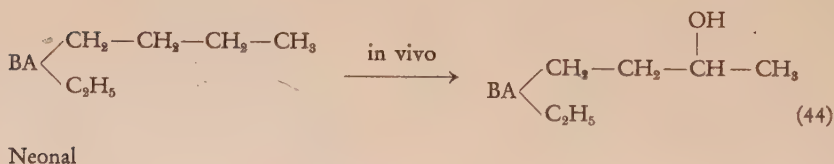
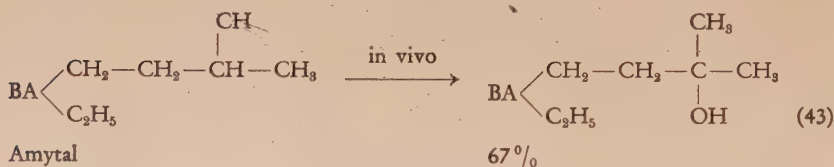
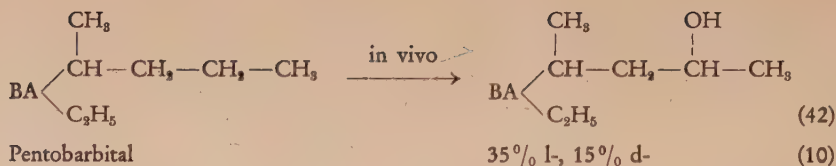


Bei der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure fand *R. Pulver*⁴¹ den analogen Metaboliten Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure.

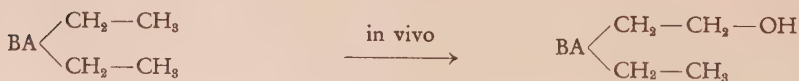


Auch bei den N-methylierten Analoga finden unter anderem die entsprechenden Ketonisierungen statt⁴⁰.

Bei der Untersuchung von Barbituraten mit längeren, offenkettigen Substituenten fand die amerikanische Forschergruppe von *Maynert* und *van Dyke* in den letzten zehn Jahren sekundäre und tertiäre Alkohole als Metaboliten:

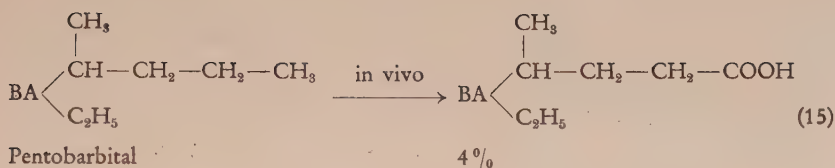


Eine von diesem Typus abweichende Reaktion bildet die Oxydation der Äthylgruppe zu primärem Alkohol. Sie konnte von *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶ bei Veronal nachgewiesen werden, allerdings in einem Ausmasse von weniger als 1 %.



Neben der Bildung von Alkoholen oder Ketonen wurde neuerdings auch eine Methyl-Oxydation der längeren Seitenkette beobachtet, nämlich die Bildung einer Carboxylsäure. Dieser Oxydationstyp war schon bei Thiobarbituraten bekannt⁴⁵.

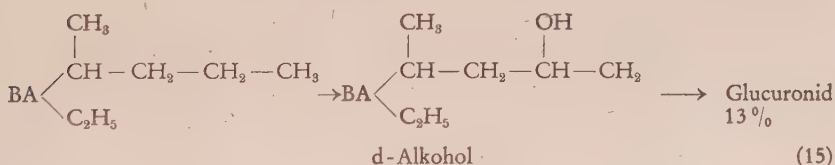




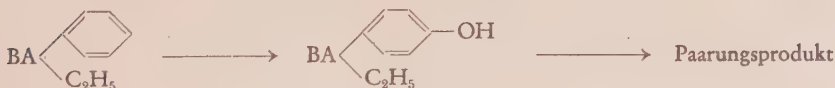
Die Tatsache, dass alle diese oxydativ veränderten Barbiturate ohne hypnotische Wirkung sind und gegenüber den ursprünglichen Hypnotica stark verminderte Toxizität aufweisen, zeigt, dass es sich hierbei um eigentliche Detoxikationsreaktionen handelt. *Cooper, Brodie und Winters*^{28, 46-50} gelang die Seitenkettenoxydation von Barbituraten in vitro mit Leberhomogenisaten. Sie stellten fest, dass der oxydative Angriff durch in den Mikrosomen von Leberzellen lokalisierte Enzyme unter Mitwirkung von Sauerstoff, TPNH und Mg^{++} stattfindet.

2. Bildung von Paarungsprodukten

Im Gegensatz zu den Oxydationsmetaboliten sind Paarungsprodukte von Barbituraten erst in jüngster Zeit festgestellt worden. Zum ersten Male gelang 1955 *Titus und Weiss*¹⁵ bei Pentobarbital der Nachweis des Glucuronids von d-5-(1-methyl-3-hydroxybutyl)-5-äthyl-barbitursäure.



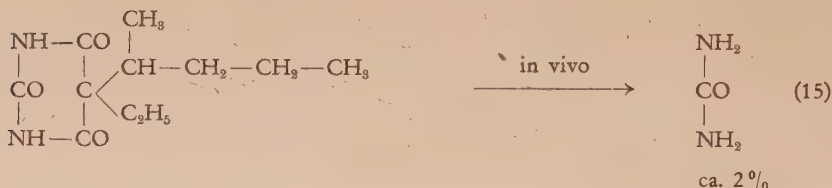
Sodann fand *Butler*⁵¹ als Metabolit von Phenobarbital 5-(p-hydroxyphenyl)-5-äthyl-barbitursäure, und zwar beim Hund fast vollständig gepaart mit Glucuronsäure, beim Menschen dagegen nur zum Teil gepaart und dabei eher mit Schwefelsäure.



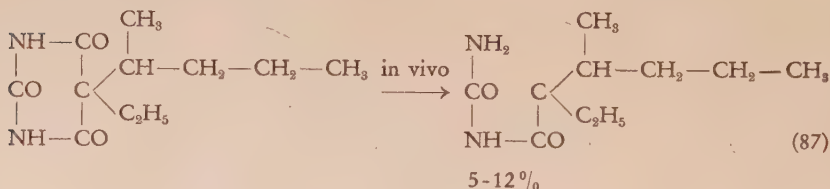
Schliesslich wiesen *Goldschmidt und Wehr*¹⁶ bei Veronal die Bildung von 2% gepaarter 5-(2-hydroxy-äthyl)-5-äthyl-barbitursäure nach. Die Partner-substanz konnte nicht identifiziert werden.

3. Spaltung des Barbitursäurerings

Dieser Abbauweg wurde längst vermutet aber erst mit Hilfe der Isotopensignierungsmethode bewiesen^{8,9}, jedoch gleichzeitig festgestellt, dass er quantitativ nur unbedeutend in Erscheinung tritt.

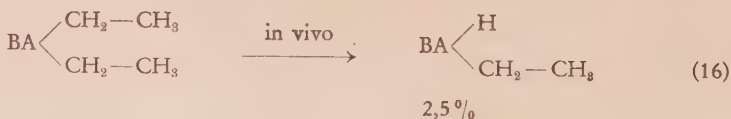


Neben der Abspaltung von Harnstoff fanden *Spector* und *Shideman*⁸⁷ bei Pentobarbital eine Ringöffnung unter Abspaltung der Gruppe 6 zu Äthyl-(1-methyl-butyl)-acetylharnstoff.



4. Desalkylierung in Stellung 5

Dieser Reaktionsmechanismus wurde erst beim Veronal von *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶ festgestellt und findet ebenfalls nur in sehr geringem Ausmasse statt.



Bei den N-methylierten Barbituraten tritt neben die beschriebenen Reaktionstypen die charakteristische N-Demethylierung, bei Thiobarbituraten die Desulfurierung, das heisst der Ersatz des Schwefelatoms durch Sauerstoff.

Das Problem eventueller Intermediär-Metaboliten, welche nicht zur Ausscheidung gelangen, wurde von den bisherigen Forschungen noch nicht tangiert.

Während viele Forscher Beiträge zur Kenntnis des Barbiturat-Stoffwechsels geleistet haben, bleibt doch sein Gesamtbild in den meisten Fällen fragmentarisch, da die Resultate quantitativ nicht gesichert sind. Das wirkliche

Bild des Stoffwechselgeschehens entsteht erst da, wo einigermaßen vollständige Bilanzen aufgestellt werden können, welche über das Schicksal der Pharmaka im Organismus in qualitativer und quantitativer Hinsicht Auskunft erteilen.

Solche Stoffwechseluntersuchungen von beträchtlicher Vollständigkeit existieren bis heute erst für Veronal und Pentobarbital dank der mehrfach erwähnten Arbeiten von *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶ bzw. *Titus* und *Weiss*¹⁵, deren Ergebnisse im folgenden zusammengestellt sind:

a) Zum Metabolismus von 5,5-Diäthyl-barbitursäure (Veronal) nach *Goldschmidt* und *Wehr*¹⁶:

Nach 75 h werden in Harn und Faeces 95 % der applizierten Radioaktivität wiederaufgefunden. Im Harn zeigt sich folgende radiochromatographische Verteilung:

- 95 % Diäthyl-barbitursäure (unverändert)
- 2,5 % Monoäthyl-barbitursäure
- 0,8 % 5-(2-hydroxy-äthyl)-5-äthyl-barbitursäure
- 2,0 % 5-(2-hydroxy-äthyl)-5-äthyl-barbitursäure-Paarungsprodukt

Wesentlich an diesen Ergebnissen ist die Tatsache, dass Veronal – entgegen allen bisherigen Behauptungen – nicht ganz unverändert ausgeschieden wird, sondern doch zu ca. 5 % metabolisiert wird. Die Äthylgruppe kann also durch Oxydation oder Elimination in vivo angegriffen werden, womit sich diese Möglichkeit auch für alle Barbiturate eröffnet, welche neben einem grösseren Substituenten eine Äthylgruppe tragen.

b) Zum Metabolismus von 5-(1-methyl-butyl)-5-äthyl-barbitursäure (Pentobarbital) nach *Titus* und *Weiss*¹⁵:

Den Autoren gelang der Nachweis von neun radioaktiven Metaboliten, von denen fünf identifiziert werden konnten.

Nr.	Rf-Wert	% der Harn-aktivität	Isolierte Substanz
1	0,86	0,8%	5-(1-methyl-butyl)-5-äthyl-barbitursäure (unverändert)
2	0,63	21,0%	d-5-(1-methyl-butyl-ol-3)-5-äthylbarbitursäure
3	0,54	41,0%	l-5-(1-methyl-butyl-ol-3)-5-äthylbarbitursäure
4	0,46	1,5%	nicht identifiziert
5	0,26	1,0%	nicht identifiziert
6	0,18	2,1%	nicht identifiziert
7	0,12	2,6%	Harnstoff
8	0,07	4,5%	5-(1-methyl-butylcarbonsäure-4)-5-äthyl-barbitursäure
9	0,03	12,4%	nicht identifiziert
10	0,01	13,6%	Glucuronid von 2
		100 %	davon 83,5% identifiziert

Die Vielheit an Metaboliten oder Metabolit-Typen deutet auf eine entsprechende Vielheit an metabolischen Mechanismen und legt diese und ähnliche Möglichkeiten bei anderen Barbituraten nahe.

Veratmung von Barbitursäuren, das heisst radioaktive Expirationskohlen-säure, konnte weder beim Veronal noch beim Pentobarbital nachgewiesen werden.

Im Falle von Pentothal, dem Thio-Analogen von Pentobarbital konnten *Taylor et al.*⁵² sogar mindestens 12 radioaktive Metaboliten nachweisen, die jedoch ausser 2,8 % Thioharnstoff nicht identifiziert wurden. Die hohe Zahl dürfte hier mit den Folgereaktionen des bei der Desulfurierung frei gewordenen Schwefels zusammenhängen.

Zur Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure

Während von klinischer und pharmakologischer Seite eine ziemlich umfangreiche Literatur ^{4,53-74} über die Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure besteht, liegt über den Stoffwechsel dieses Hypnoticums einzig die Untersuchung von *R. Pulver* aus dem Jahre 1943 vor⁴¹.

Der Autor verabreichte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure durch subcutane Injektionen an Kaninchen. Im Harn der Tiere konnte kein unverändertes Material nachgewiesen werden, doch gelang die Isolierung eines Metaboliten aus dem Ätherextrakt. Mikroanalyse, Bildung eines Semicarbazons und die Analysenwerte dieses letzteren liessen den Metaboliten als Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure erkennen. Ein strenger Strukturbeweis wurde nicht geliefert; insbesondere bleibt die Lage der Ketogruppe im 7-Ring ungewiss. Die Menge des isolierten Metaboliten betrug nur 4,6 % des applizierten Barbiturates. Das Produkt zeigt keinerlei hypnotische Wirkung und 20 mal geringere Toxizität als Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure.

Beim Menschen ergab sich qualitativ derselbe Befund, doch betrug die Menge des Metaboliten nur ca. 0,5 %.

Pulver nahm aus diesen Resultaten an, dass der verbleibende Anteil des Pharmakons im Organismus rasch zu niedermolekularen Spaltprodukten abgebaut werde, wahrscheinlich zu solchen des normalen Stoffwechsels.

Der isolierte Metabolit ist das Analogon des bei der Cyclohexenyl-äthyl-barbitursäure gefundenen^{39,40}, nämlich das im Cycloalkenyl-Substituenten ketonisierte Barbiturat. Dies erscheint plausibel, doch ist wegen der chemisch unterschiedlichen Eigenschaften von 6- und 7-Ring in dieser Beziehung einige Vorsicht geboten. Sehr unwahrscheinlich erscheint nach dem heutigen Stand der Barbituratforschung der radikale Abbau in kleine Bruchstücke. Ein solcher wurde bisher noch nie festgestellt.

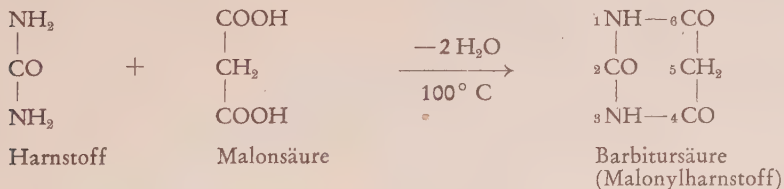
II. SYNTHESE VON ^{14}C -SIGNIERTER 5,5-CYCLOHEPTENYL-ÄTHYL-BARBITURSÄURE

Die Synthese der unsignierten 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure ist nicht neu, doch war sie in unserem Falle an die Erfüllung besonderer Anforderungen geknüpft, was eine grössere Anzahl von Vorversuchen mit entsprechenden Verfahrensänderungen erforderte.

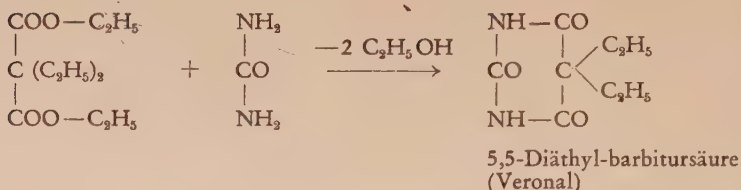
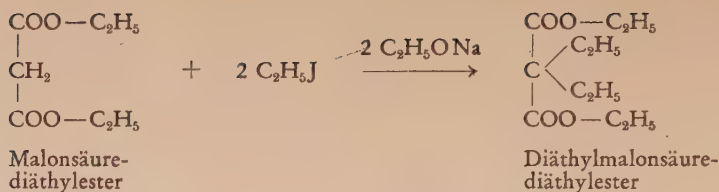
Die beträchtliche Kostspieligkeit von ^{14}C -haltigen Ausgangsmaterialien erlaubte nur die Herstellung einer solchen Menge, wie sie zur Ausführung der geplanten Versuchsserien erforderlich war (0,5–1,0 gr). Zudem musste die Synthese so gesteuert werden, dass die in der isotopenhaltigen Ausgangskomponente eingesetzte Radioaktivität im Endprodukt zu einer brauchbaren spezifischen Aktivität von ca. 10^6 c/min. mg (counts per min. per mg) führt. Die Synthese musste daher mit sehr kleinen Ansätzen durchgeführt und die bestehenden Vorschriften auf diese erschwerten Verhältnisse geprüft und abgeändert werden. Die einzelnen Stufen der Synthese mussten mit inaktivem Material so lange ausgearbeitet werden, bis sie eine tragbare und vor allem reproduzierbare Ausbeute lieferten. Die aus diesen Modellversuchen hervorgegangenen Arbeitsvorschriften wurden dann auf eine Totalsynthese und schliesslich, nach Ausschaltung aller vorausschbaren Risiken, auf die radioaktive Synthese übertragen.

A) Theoretischer Teil

Barbitursäure oder Malonylharnstoff wird am einfachsten durch Kondensation seiner beiden Bestandteile Malonsäure (resp. -ester) und Harnstoff unter Mithilfe wasserbindender Substanzen hergestellt⁷⁵:

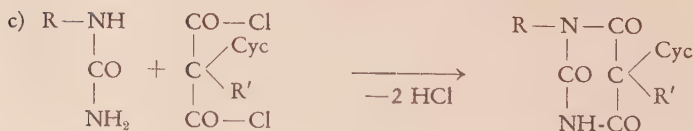
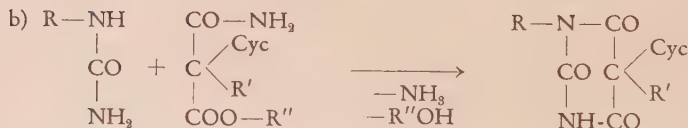
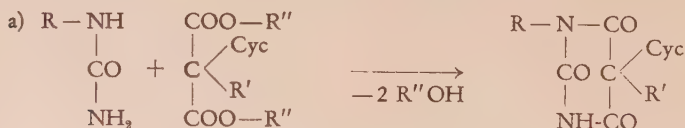


Bei den als Hypnotica verwendeten 5,5-Dialkylbarbitursäuren werden vor der Harnstoffkondensation die beweglichen H-Atome der Methylen-Gruppe der Malonsäure substituiert. Ein Beispiel dafür bildet die Darstellung von Veronal:

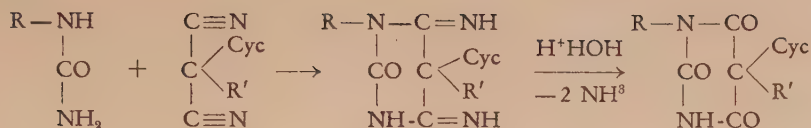


Sind die einzuführenden Substituenten komplizierterer Natur, so müssen sie auf anderen Wegen zur Substitutionsreaktion gebracht werden, wobei unter Umständen auch Malonsäure und Harnstoff in modifizierten Formen verwendet werden. Dies ist auch bei der 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure ratsam, wo ein siebengliedriger alicyclischer Alkenylrest einzuführen ist.

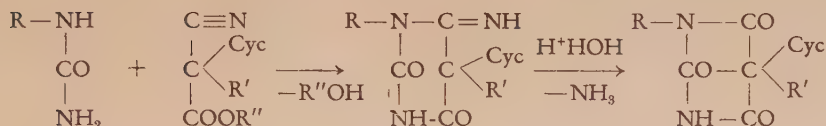
Im Patent der Herstellerfirma⁷⁶ werden folgende allgemeine Darstellungsmethoden für 5-Cyclohepten-1-yl-5-alkyl-(oder alkenyl)-barbitursäuren oder die entsprechenden 1-N-alkylierten Produkte angegeben*):



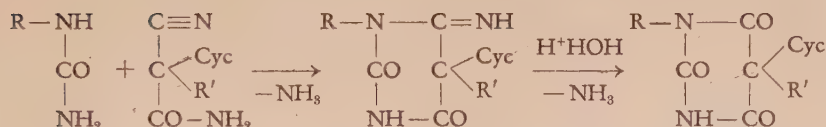
d)



e)

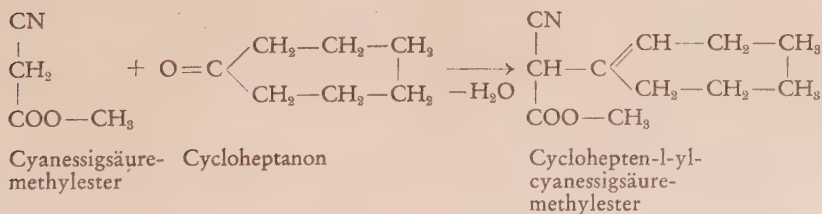


f)



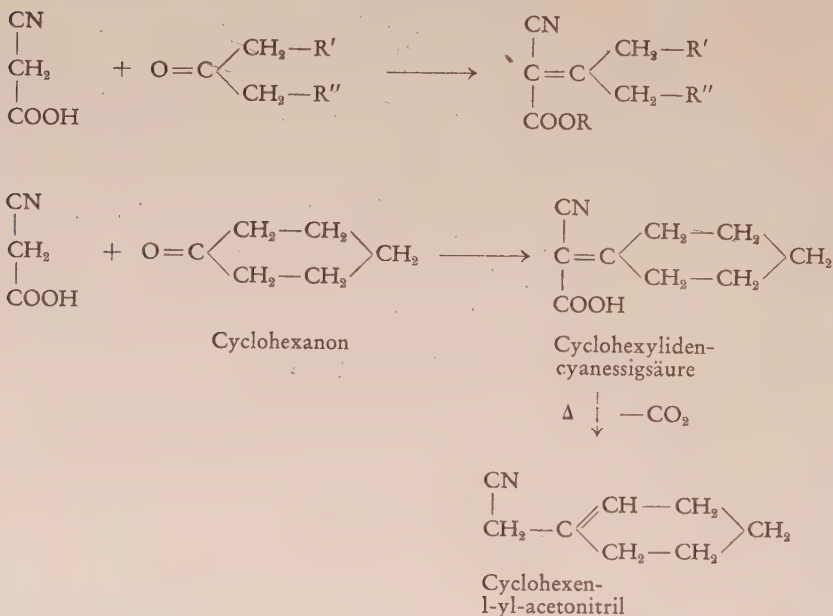
*) Cyc = Cyclohepten-1-yl
 R = H oder Alkyl
 R' = Alkyl oder Alkenyl
 R'' = Alkyl

Wir bedienten uns für unsere Zwecke der allgemeinen Methode c), wobei wir jedoch an Stelle von Harnstoff 1-Cyan-guanidin (1-Cyan-2-imino-harnstoff, „Dicyandiamid“) verwendeten. – Vor dieser Kondensation zur Barbitursäure mussten die Substituenten der 5-Stellung in den „Malonsäureteil“ eingeführt werden. In einer ersten Stufe wurde durch eine Cope-Kondensation die Cycloheptenyl-Verbindung hergestellt:



Es muss betont werden, dass es sich bei dieser Reaktion nicht um eine eigentliche Cope-Kondensation handelt^{77,78}, da sich bei dieser die Doppel-

bindung nicht im aliphatischen resp. alicyclischen Ketonrest, sondern in der „Brücke“ ausgebildet. Dies gilt ebenso für die Cope-Kondensation mit Cyclohexanon (oder Cyclopentanon), welches allerdings durch thermische Decarboxylierung nachträglich in die (Nor-)Cyclohexenyl-Verbindung⁷⁹ umgewandelt werden kann.



Dieser Tatbestand weist auf den Einfluss und die besonderen Bedingungen des alicyclischen 7-Ringes.

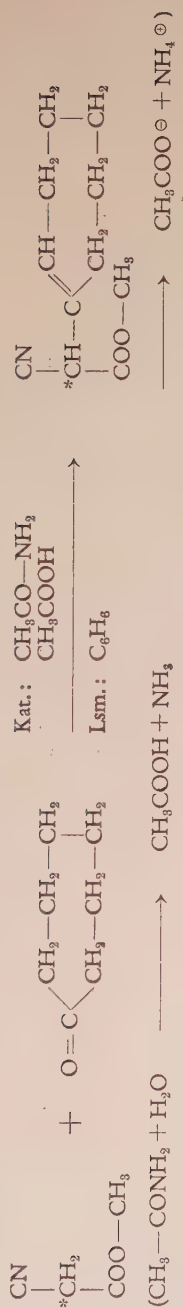
Die Einführung des zweiten Substituenten, der Äthylgruppe, geschah durch Äthylierung des Cyclo-heptenyl-cyan-essigsäure-methylesters durch Äthyljodid mit Na-Alkoholat.

Der somit erhaltene disubstituierte Cyanessigsäureester wurde schliesslich zur Bildung des Barbitursäurerings mit Cyanguanidin kondensiert. Dabei entsteht als Vorstufe die disubstituierte 2,6-Diimido-3-cyan-barbitursäure. Durch Hydrolyse gehen die Imidogruppen unter NH_3 -Abspaltung in Keto-gruppen über, während die Nitrilgruppe zum Carbamid verseift wird, welches unter Decarboxylierung die NH-Gruppe der Stellung 3 liefert.

Für die radioaktive Signierung war die Stellung 5 vorgesehen. Es wurde daher von ^{14}C -signiertem Cyanessigsäuremethylester $\text{N}^*-\text{C}-\text{H}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$ ausgegangen.

Die gesamte radioaktive Synthese von 5,5-Cyclohepten-1-yl-äthyl-barbitursäure zeigt somit folgende Formulierung:

Stufe I:

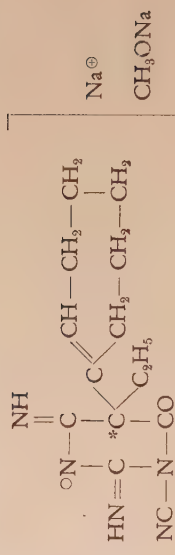


Stufe II:

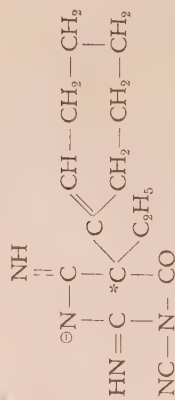


Stufe III:

a) Kondensation



b) Verseifung



Für die praktische Ausführung der Synthese stand uns eine von der J. R. Geigy A.G. überlassene Vorschrift zur Verfügung. Sie diente als Ausgangspunkt zu unsern Vorversuchen, welche die optimalen Bedingungen für unsere speziellen Verhältnisse (sehr kleine Ansätze, radioaktive Isotopen-Verbindungen) erkennen lassen sollten.

B) Experimenteller Teil

1. Modellversuche mit inaktivem Material

a) Zur Stufe I. Cope-Kondensation von Cyanessigsäure-methylester mit Cycloheptanon zu Cyclohepten-(1)-cyanessigsäure-methylester:

Diese erste Stufe bot die grössten Schwierigkeiten und wurde im 0,05 Mol-Ansatz unter variierenden Bedingungen 21 mal ausgeführt. Die Ausbeute konnte dabei von 20 auf 68 % gesteigert werden. Insbesondere mussten die optimalen Bedingungen für die Entfernung des Reaktionswassers und des Lösungsmittels durch azeotrope Destillation gefunden werden. – Die von S. Dev^{80,81} empfohlene Verwendung von Piperidin und Benzylamin als Katalysator hat sich nicht bewährt.

b) Zur Stufe II. Äthylierung von Cyclohepten-(1)-yl-cyanessigsäure-methylester zu Cyclohepten-(1)-äthyl-cyanessigsäure-methylester: Diese Stufe bot keine besonderen Schwierigkeiten. Im 0,05 Mol-Ansatz wurde eine Ausbeute von 75 % erzielt.

c) Zur Stufe III. Kondensation von Cyclohepten-(1)-yl-äthyl-cyanessigsäure-methylester mit 1-Cyanguanidin und Hydrolyse zu 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure:

Während die Kondensation stets glatt verlief, wurden die Bedingungen der Hydrolyse in 12 Ansätzen verbessert (Verseifung in organischer Phase, Reaktionsdauer). Die Ausbeute konnte von 59 auf 78 % gesteigert werden.

d) Reinigung: Da die Verluste bei der Umkristallisation des Rohproduktes beträchtlich sind, wurde in einer Versuchsserie eine Reinigungsmethode entwickelt, die ohne grosse Verluste ein Produkt von guter Reinheit liefert.

e) Totalsynthese: In dieser wurde jede Stufe gemäss den in den Modellversuchen ermittelten optimalen Bedingungen ausgeführt. Die praktische Ausführung sowie die Zwischenprodukte sind im folgenden Kapitel (radioaktive Synthese) in extenso beschrieben. Das erhaltene Produkt zeigte bei guter Ausbeute befriedigende Reinheitskriterien (Elementaranalyse, Schmelzpunkt, Schmelzbild).

2. Synthese von 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure mit ¹⁴C-Signierung in Stellung 5

Die Synthese wurde nach dem Modell der inaktiven Totalsynthese, ebenfalls im 0,01 Mol-Ansatz ausgeführt.

Stufe I:

Apparatur: 50 ml-Dreihalskolben mit Rührwerk, Rückflusskühler (später Destillationsaufsatz).

Ansatz: 0,09 gr $\text{CN-}^{14}\text{CH}_2\text{-COO-CH}_3$ (1 m-Curie entsp.
 $2,22 \cdot 10^9$ c/min).
 0,90 gr $\text{CN-CH}_2\text{-COO-CH}_3$ dest.
 1,28 gr Cycloheptanon dest.
 0,64 gr Eisessig dest.
 0,20 gr Acetamid

Der Ansatz wurde bis zur klaren Lösung gerührt und über Nacht stehen gelassen. Nach Zugabe von 3 ml Benzol puriss. dest. wurde bei 130°C Badtemperatur und langsamem Rühren 3 h am Rückfluss gekocht. Beim abschliessenden Destillationsprozess zur Entfernung von Lösungsmittel und Reaktionswasser wurde der Kolben tief ins Heizbad getaucht und wie folgt verfahren:

20 min	130–140°C	5 min	130–170°C
5 "	140–170°C	10 "	170–130°C
5 "	170°C	30 "	130°C
10 "	170–130°C		+ 3 ml Benzol
35 "	130°C	15 "	130°C
	+ 3 ml Benzol	40 "	140°C
35 "	130°C		3 1/2 h Destillationsdauer

Das dunkelbraune Reaktionsgemisch wurde nach dem Erkalten mit 5 ml Benzol verdünnt und im Scheidetrichter wie folgt gewaschen:

2 · 15 ml H_2O

1 · 5 ml Na_2CO_3 ges. (Trennung durch Zusatz von Benzol begünstigt)

4 · 15 ml H_2O (bis neutrale Reaktion)

Die vereinigten Waschwässer wurden zweimal mit je 10 ml Benzol ausgeschüttelt, die Benzolfractionen vereinigt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Benzol der trockenen Lösung wurde gewöhnlich abdestilliert und der Rückstand der Vakuumdestillation im Mikrodestillationsapparat unterworfen.

Wir erhielten 1,40 gr fast farblosen Cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester vom Siedepunkt $158\text{--}ca. 160^\circ\text{C}$ bei 11 mm Hg. Die Ausbeute betrug 73,7 % (Modellversuch: 62 %).

Stufe II:

Apparatur wie oben, aber mit Tropftrichter. Gut getrocknet und mit CaCl_2 -Rohren verschlossen.

Ansatz: 0,166 gr Natrium
 2,6 ml Methanol super-abs.
 1,4 gr Cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester
 1,60 gr Äthyljodid

Natriummethylat wurde aus 1,66 gr Na und 26 ml Methanol in zehnfacher Menge angesetzt, wovon ein Zehntel verwendet wurde. Die Alkoholat-Lösung wurde im Kolben auf 50°C erwärmt und die ganze Menge Cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester zugesetzt (mit Methanol nachgespült).

Das Äthyljodid wurde während 45 min zugetropft, am Schluss weitere 0,2 gr zugesetzt und über Nacht bei 50°C weiter gerührt. Darauf wurden (bei fehlender alkalischer Reaktion auf Phenolphthaleinpapier) Methanol und wenig Äthyljodid auf dem Wasserbad abdestilliert und die letzten Anteile am Vakuum entfernt. Zur Abtrennung von NaJ wurde der salzige Rückstand in 8 ml Äther und 15 ml H₂O aufgenommen, verteilt und im Scheidetrichter getrennt. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit je 8 ml Äther ausgeschüttelt, die Ätherfraktionen vereinigt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Die klare Lösung wurde auf dem Wasserbad, dann am Vakuum vom Äther befreit und der Rückstand im Mikrodestillationsapparat der Vakuumdestillation unterworfen. Es wurden 1,13 gr farbloser Cycloheptenyl-äthyl-cyanessigsäure-methylester vom Siedepunkt 150–ca. 155°C (11 mm Hg) gewonnen. Dies entspricht einer Ausbeute von 70,5 % (Modellsynthese: 61 %).

Aus der wässrigen Phase wurden 1,06 gr NaJ isoliert. Da die berechnete Menge 1,09 gr beträgt, kann eine quantitative Äthylierung angenommen werden.

Stufe III:

Apparatur wie bei II.

Ansatz: 0,180 gr Natrium
10,5 ml Methanol super-abs.
0,460 gr Cyan-guanidin
1,130 gr Cycloheptenyl-äthyl-cyanessigsäure-methylester.

Das fein gepulverte, während 48 h bei 100°C im Vakuum getrocknete Cyanguanidin wurde in der Alkoholatlösung bei 20°C vollständig gelöst und der Cycloheptenyl-äthyl-cyanessigsäure-methylester mit etwas Methanol verdünnt zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst eine Stunde bei 20°C gerührt, dann über Nacht am Rückfluss siedend bei einer Badtemperatur von 80°C. Allfällige Lösungsmittelverluste wurden ergänzt. Die klare Lösung enthielt ganz wenig einer weissen Ausscheidung. Nach dem Erkalten wurden zur Verseifung 10,5 ml HCl conc. direkt in die methanolische Lösung zugesetzt, wobei viel feiner Niederschlag gebildet wurde. Unter schnellem Rühren wurde durch Kochen am Rückfluss (Badtemperatur ca. 95°C) während 7 h fertig verseift und wenig Lösungsmittel nachgesetzt. Nach etwa 4 h war der Niederschlag bis auf den schon vorher vorhandenen minimalen Rest gelöst, welcher letzterer durch Filtration der heissen Lösung entfernt wurde. Nach der Abtrennung des Methanols durch Destillation und am Vakuum wurde die salzsaure wässrige Lösung bei ca. 2°C zur Kristallisation stehen gelassen, die Kristalle darauf abgenutscht und mit möglichst wenig Eiswasser bis zur neutralen Reaktion des Filtrates gewaschen. Die Kristalle wurden im Exsikkator über CaCl₂ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 0,910 gr, entsprechend 71 % (Modellversuch: 89 %). Der Schmelzpunkt wurde zu 173–175°C bestimmt; die Schmelze enthielt etwas ungeschmolzenes Material. Die Kristalle waren braunstichig und von starkem, nicht unangenehmem Geruch.

Reinigung des Rohproduktes:

0,910 gr rohe Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wurden in 23 ml 96 %igem Äthanol gelöst und mit einer kleinen Spatelspitze aktivierter Tierkohle 5 min am Rückfluss gekocht. Die erkaltete Lösung wurde filtriert und durch eine Säule von 10 mm aktiviertem Al_2O_3 fließen gelassen, diese mit 20, 15 und 5 ml Äthanol nachgespült. Von den vereinigten Äthanolfraktionen wurde das Lösungsmittel auf dem Dampfbad abgetrieben, der Rückstand im Vakuum bei 100°C getrocknet, pulverisiert und bis zur Gewichtskonstanz weiter getrocknet. Die Ausbeute an Endprodukt betrug 0,769 gr, das sind 84,5 % Reinigungsausbeute. Damit betrug die Totalausbeute über die ganze Synthese 31 %.

^{14}C -signierter 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure:

769 mg vom Schmelzpunkt $173\text{--}174^\circ\text{C}$. Das Schmelzbild ist normal und zeigt bei mikroskopischer Betrachtung kein höherschmelzendes Material. Gelbstichige Kristalle von schwachem Geruch. – Für die Stoffwechsel-Versuche ist es wesentlich, dass allfällig noch vorhandene Verunreinigungen frei von Radioaktivität sind, das heisst, dass diese letztere ausschliesslich an das Barbiturat gebunden ist. Zur Überprüfung dieses Tatbestandes wurde das aktive Produkt papierchromatographiert (aufsteigend mit Isopropanol/Chloroform/Ammoniak ges. 5:2:3). Dabei, sowie bei einem Vergleichschromatogramm mit reiner, inaktiver Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure betrug der Rf-Wert 0,9. Bestimmung der Radioaktivität auf dem Papierchromatogramm ergab, dass die gesamte Aktivität ausschliesslich auf dem spot von Rf 0,9 lag. Die für die Tierversuche an unser Produkt gestellten Reinheitskriterien konnten damit als erfüllt betrachtet werden.

Berechnete Radioaktivität des Produktes bei 1000 μ -Curie Ansatz und 31 % Ausbeute:

$$\begin{aligned}\text{Gesamtaktivität} &= 0,31 \cdot 1000 &= 310 \text{ } \mu\text{-Curie} = 6,88 \cdot 10^8 \text{ c/min.} \\ \text{Spezifische Aktivität} &= \frac{310}{769} &= 0,43 \text{ } \mu\text{-Curie/mg} \\ & &= 8,94 \cdot 10^5 \text{ c/min mg}\end{aligned}$$

Die aus sechs Bestimmungen gemittelte spezifische Aktivität der ^{14}C -signierten Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure betrug $9,1 \cdot 10^5 \text{ c/min mg}$.

III. AUSSCHIEDUNG UND VERTEILUNG VON 5,5-CYCLOHEPTENYL-ÄTHYL-BARBITURSAURE IM ORGANISMUS

Zur Bestimmung von Verteilung, Retention und Ausscheidung wurden zwei Serien von Tierversuchen mit ^{14}C -signierter 5,5-Cycloheptenyl-Äthyl-barbitursäure durchgeführt:

1. Kurzfristige Versuche mit Bestimmung der Radioaktivitäten von Exkreten, Organen und Carcass, und
2. Langfristige Versuche mit periodischer Aktivitätsbestimmung von Harn und Faeces.

In Ergänzung dazu wurde die Ausscheidung durch die Galle untersucht.

A) Ausscheidung und Verteilung nach 15 Stunden

1. Methode

Die Tierversuche wurden an weissen Ratten von ca. 250 gr Gewicht durchgeführt. Jedem Versuchstier wurde eine pharmakologisch wirksame Dosis von 20 mg Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure per os appliziert. Die Tiere verblieben sodann während 15 h in gläsernen Stoffwechsellkäfigen, welche ein quantitatives Auffangen von Harn und Faeces erlauben. Die Stoffwechsellkäfige standen mit einer Atmungsapparatur in Verbindung, welche trockene, CO_2 -freie Luft zuführt und die Exspirationskohlendensäure in Natronlauge fixiert. Es wurde stündlich neue Absorptionslauge vorgesetzt und die Stundenfraktionen zur Aufarbeitung aufbewahrt. Nach Versuchsende wurden die Tiere getötet, sezirt und folgende Organe herauspräpariert: Leber, Nieren, Gehirn-Rückenmark, Magen-Darmtractus, Darminhalt. Diese Organe, sowie der verbleibende Carcass, wurden homogenisiert, entwässert, und die Lipidanteile extrahiert. Die Lipid- und Nichtlipid-Fractionen gelangten getrennt zur Aktivitätsbestimmung, um eine allfällige Anreicherung im Körperfett zu erfassen. Das Carbonat der Laugenfraktionen wurde mit BaCl_2 gefällt und die Radioaktivität des BaCO_3 bestimmt. Schliesslich gelangten aliquote Teile des Harnes und der getrockneten Faeces zur Aktivitätsbestimmung.

Es ist einleuchtend, dass die Methode nur die Verteilung der (radioaktiven) Substanz ermittelt, ohne Auskunft darüber zu geben, ob sie als Metabolit oder in unveränderter Form vorliegt.

2. Ergebnisse

Der vollständige Verteilungs- und Veratmungsversuch wurde an zwei Tieren durchgeführt. Über die in den Organen wiederaufgefundenen Radioaktivitäten geben die folgenden Tabellen Auskunft. Tabelle 1 zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten. Durch Multiplikation mit den entsprechenden Gewichtswerten werden die totalen Aktivitäten erhalten, welche in Tabelle 2 zusammengestellt sind.

Mit dem Pharmakon wurde eine Radioaktivität von je $22,0 \cdot 10^6$ c/min appliziert. Durch Bezug auf diesen Wert erhalten wir die prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Organismus, was in Tabelle 3 dargestellt ist.

Tabelle 1

Spezifische Aktivitäten (c/min mg) einzelner Körperteile 15 h nach peroraler Gabe von signierter 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure

	Tier 1		Tier 2	
	Lipid	Rückst.	Lipid	Rückst.
Leber	149	0	135	0
Niere	800	20	780	25
Gehirn-Rückenmark	40	0	46	0
Magen-Darmtractus	295	0	255	0
Darminhalt	11000	364	10200	615
Carcass	0	0	0	0

Tabelle 2

Gesamtaktivitäten (c/min)

	Tier 1		Tier 2	
	Lipid	Rückst.	Lipid	Rückst.
Leber	$0,044 \cdot 10^6$	0	$0,054 \cdot 10^6$	0
Niere	$0,056 \cdot 10^6$	$0,006 \cdot 10^6$	$0,047 \cdot 10^6$	$0,006 \cdot 10^6$
Gehirn-Rückenmark	$0,002 \cdot 10^6$	0	$0,003 \cdot 10^6$	0
Magen-Darmtractus	$0,179 \cdot 10^6$	0	$0,118 \cdot 10^6$	0
Darminhalt	$1,44 \cdot 10^6$	$0,518 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$	$0,413 \cdot 10^6$
Carcass	0	0	0	0

Tabelle 3

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten auf die einzelnen Körperteile

	Tier 1			Tier 2		
	Lipid	Rkst.	total	Lipid	Rkst.	total
Leber	0,20	0	0,20	0,25	0	0,25
Niere	0,25	0,03	0,28	0,21	0,03	0,24
Gehirn-Rückenmark	0,01	0	0,01	0,01	0	0,01
Magen-Darmtractus	0,81	0	0,81	0,54	0	0,54
Darminhalt	6,55	2,36	8,91	5,05	1,88	6,93
Carcass	0	0	0	0	0	0
total	7,82	2,39	10,21	6,06	1,91	7,97

Tabelle 4 zeigt die Konzentration in den Organen in mg pro kg Lebendgewicht. Die Angaben sind aus den Werten der Tiere 1 und 2 ermittelt.

Tabelle 4

Konzentration der Organe an Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure nach 15 h

Leber	6 mg/kg
Nieren	33 mg/kg
Gehirn-Rückenmark	2 mg/kg
Magen-Darmtractus	17 mg/kg
Carcass	0

Aus Tabelle 3 ersehen wir die Verteilung der Aktivität zwischen der Lipidphase und den Gewebsrückständen. Die prozentuale Verteilung zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5

Verteilung der Aktivität zwischen Lipid und Rückstand

	Lipid	Rückstand
Tier 1	76,5 %	23,5 %
Tier 2	76,2 %	23,8 %

Die Ermittlung der Ausscheidung im Harne nach 15 h konnte an sechs Versuchstieren durchgeführt werden und ist in Tabelle 6 dargestellt.

Zur Bestimmung der mit den Faeces ausgeschiedenen Aktivität wurden vier Tierversuche ausgeführt, wobei nach 15 h bei einem dieser Versuchstiere noch keine Faeces vorlag. Die Resultate zeigt Tabelle 7.

Tabelle 6
Im Harn ausgeschiedene Aktivität nach 15 h

Tier Nr.	Aktivität appl. c/min	Aktivität Harn c/min	Aktivität Harn ‰	Durch- schnitt
1	22,0 · 10 ⁶	18,32 · 10 ⁶	83,4 ‰	83,4 ‰
3	24,1 · 10 ⁶	21,35 · 10 ⁶	88,5 ‰	
4	36,2 · 10 ⁶	31,5 · 10 ⁶	87,0 ‰	
5	19,0 · 10 ⁶	15,5 · 10 ⁶	81,6 ‰	
6	18,91 · 10 ⁶		*80,7 ‰	
7	20,25 · 10 ⁶		*79,0 ‰	

*) aus den langfristigen Versuchen graphisch ermittelte Werte (vgl. B,2).

Tabelle 7
In den Faeces ausgeschiedene Aktivität nach 15 h

Tier Nr.	Aktivität appl. c/min	Aktivität Faeces c/min	Aktivität Faeces ‰	Durch- schnitt
1	22,0 · 10 ⁶	0,34 · 10 ⁶	1,55 ‰	2,1 ‰
3	24,1 · 10 ⁶	0,66 · 10 ⁶	2,74 ‰	
4	24,1 · 10 ⁶	0,50 · 10 ⁶	2,08 ‰	

In der Ausatemungsluft konnte keine Radioaktivität nachgewiesen werden. Das aus der Expirationskohlenensäure gewonnene BaCO₃ erwies sich in allen Fraktionen als inaktiv.

Die in den Tabellen 1–7 aufgeführten Messresultate zeigen eine für biologische Versuche gute Übereinstimmung. Sie dürfen daher gemittelt werden und ergeben die in Tabelle 8 zusammengestellte Aktivitätsbilanz. Sie gibt Auskunft über Ausscheidung und Retention der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure bei der Ratte.

Tabelle 8

Aktivitätsbilanz von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure nach 15 h
bei der Ratte

Harn	83,4 ‰	
Faeces	2,1 ‰	
Expirations-CO ₂	0 ‰	
Ausscheidung total		85,5 ‰
Darminhalt	7,92 ‰	7,92 ‰
Leber	0,22 ‰	
Niere	0,26 ‰	
Gehirn-Rückenmark	0,01 ‰	
Magen-Darmtractus	0,67 ‰	
Organe total		1,16 ‰
Carcass	0 ‰	0 ‰
Bilanz	94,58 ‰	94,58 ‰

3. Diskussion der Ergebnisse

a) Da die Expirations-CO₂ bei allen Versuchen inaktiv blieb, muss geschlossen werden, dass keine Veratmung und kein tiefgreifender Abbau der Verbindung stattfindet.

b) Dies geht auch aus der im Harn aufgefundenen sehr hohen Aktivität hervor. Wie die Tabelle 6 zeigt, konnten im Harne 79–88,5 ‰ der applizierten Aktivität nachgewiesen werden, wozu sich in den Faeces eine weitere Ausscheidung von 1–3 ‰ addiert (Tabelle 7). Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wird daher innerhalb 15 h sicher zu 80–90 ‰ durch Ausscheidung aus dem Organismus entfernt.

c) In den Organen konnten nur sehr geringe Aktivitätsanteile nachgewiesen werden. Leber, Niere, Gehirn-Rückenmark und Magen-Darmtractus wiesen zusammen wenig mehr als ein Prozent der applizierten Aktivität auf und in den verbleibenden Carcassteilen konnte keine Aktivität mehr aufgefunden werden. – Eine Retention oder Akkumulation von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure in diesen Organen findet daher nicht statt.

d) Im Darminhalt fanden sich noch ca. 8 ‰ der applizierten Aktivität. Ob dieser nicht unbedeutende Anteil zur spätern Ausscheidung mit den Faeces oder zur Rückresorption gelangt, musste durch weitere Versuche entschieden werden.

e) Vergleicht man die Verteilung der Aktivität zwischen Lipid und Nichtlipid in den Organen und im Darminhalt, so ergibt sich ein Verhältnis von ca. 3:1. Die Affinität zum Lipid ist also deutlich grösser und entspricht somit ungefähr den Löslichkeitsverhältnissen von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure in Fettlösungsmitteln und Wasser. Von einer Speicherung im Körperfett kann aber nicht gesprochen werden.

4. Experimentelles

a) Versuchstiere: Zur Verwendung gelangten weibliche weisse Ratten aus dem langjährigen Inzuchtstamm des Schweizerischen Vitamininstitutes Basel.

b) Applikation: Bei der geringen Wasser- und Öllöslichkeit applizierten wir das Barbiturat in Form seines wasserlöslichen Na-Salzes.

Vorversuche zeigten, dass durch die Alkalität keine Verätzungen oder Veränderungen der Oesophagus- und Magenschleimhäute eintraten.

Die Applikationslösung wurde wie folgt hergestellt: 45 mg aktive Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure und eine Spatelspitze K_2CO_3 werden mit H_2O dest. heiss gelöst und auf 2,25 ml Lösung aufgefüllt. Der pH-Wert dieser 2 %igen Lösung liegt zwischen 9,1 und 9,3. Der angegebene Ansatz gilt für einen Versuch an zwei Tieren. Jedem Tier werden 1,00 ml Lösung verabreicht (20 mg, ca. $20 \cdot 10^6$ c/min = 10 μ -Curie), während 0,20 ml als Aliquot zur Aktivitätsbestimmung verwendet werden. – Die perorale Verabreichung an die Ratten erfolgt mit der graduierten Injektionsspritze (1 ml) und an die Nadel aufgesetzter Schlundsonde, welche tief in den Oesophagus eingeführt werden kann.

Da die Alkalialztlösungen dieses Barbiturates nach Grote⁴ schlechte Haltbarkeit aufweisen, wurden sie jedesmal vor dem Versuch frisch hergestellt.

c) Stoffwechselversuch: Die hypnotische Wirkung der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure trat bald nach der Applikation ein und dauerte 2–4 h. Die Tiere erhielten während des 15-stündigen Versuches kein Futter, wohl aber Trinkwasser. – Sie wurden nach Versuchsende mit Leuchtgas getötet und anschliessend Leber, Nieren, Gehirn und Rückenmark sorgfältig herauspräpariert. Vom Magen-Darmtractus wurde das Mesenterialfett entfernt und zum Carcass gegeben. Der Darminhalt wurde möglichst sorgfältig ausgetrieben und separat weiter behandelt. – Organe und Darminhalt wurden im Homogenisator unter Aceton zerkleinert. Der gesamte Carcass erfuhr diese Behandlung in einer Zerkleinerungsmaschine.

d) Aufarbeitung der Körperteile: Die Homogenisate wurden zur Entwässerung mehrmals mit Aceton behandelt und abgenutscht. Der getrocknete Rückstand erfuhr zur Entfernung der noch verbleibenden Lipide eine Aetherextraktion während 6–7 h im Soxhlet-Apparat. Das extrahierte Gewebshomogenisat wurde getrocknet. Die vereinigten Acetonphasen (Lipide + Wasserlösliches) wurden vom Lösungsmittel befreit und nach Zugabe von Wasser mit dem lipidhaltigen Ätherextrakt vereinigt. Nach Extraktion und Trennung im Scheidetrichter wurde die wässrige Phase zur Trockene eingedampft und dieser Rückstand mit dem obigen Gewebshomogenisat vereinigt. Durch Pulverisieren und Homogenisieren wurde der lipidfreie Rückstand erhalten. – Die ätherische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel völlig entfernt. Dies lieferte die extrahierten Gesamtlipide.

e) Aufarbeitung der Exkrete: Der angefallene Harn inclusive das zum Ausspülen der Stoffwechselkäfge verwendete Wasser wurden auf ein be-

stimmtes Volumen gebracht und filtriert. Von dieser Harnlösung gelangten aliquote Teile zur Aktivitätsbestimmung.

Die Faeces wurden quantitativ gesammelt und im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Homogenisieren mit Mörser und Schlagmühle gelangten aliquote Teile zur Aktivitätsbestimmung.

Die Exspirationskohlenensäure wurde während des Versuches jeweils 1 h in 100 ml 1,5 n NaOH geleitet. Diese Stundenproben wurden zu 250 ml Lösung verdünnt und 25 ml davon zur Fällung verwendet. Als Puffer wurde ein 20 %iger Überschuss NH_4Cl (bezogen auf NaOH) in Form von 2 n Lösung zugesetzt und mit H_2O verdünnt (100 ml auf 100 mg zu erwartendes BaCO_3). Die Fällung geschah siedend heiss mit einem doppelten Überschuss an BaCl_2 (0,3 n Lösung). Nach der Abkühlung unter Luftabschluss wurde der Niederschlag im Glasfiliertiegel (G 4) gesammelt, mit Eiswasser gewaschen und bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. – Für alle Operationen wurde CO_2 -freies destilliertes Wasser verwendet. Ein Aliquot des BaCO_3 gelangte als solches zur Aktivitätsbestimmung.

f) Aktivitätsbestimmungen: Bei Organrückständen, Lipiden und Faeces wurden je wenige mg des homogenen Materials der Mikroverbrennung mit Chromsäure unterworfen, das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ quantitativ in einem Zählrohr aufgefangen und die Stosszahl ausgezählt. – Bei Harn, Applikations- und anderen Lösungen wurden aliquote Teile von 0,1–0,4 ml zuerst im Vakuumexsikkator über CaCl_2 eingedunstet und die Rückstände wie oben der Mikroverbrennung unterworfen. Die Erzielung optimaler Bedingungen hinsichtlich Substanzmenge und Aktivität wurde nach Möglichkeit angestrebt und eventuell durch Verdünnung mit inaktiver Substanz verwirklicht.

B. Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung innerhalb zehn Tagen

1. Methode

Für die langfristigen Stoffwechselversuche verwendeten wir analoge Tiere, denen per os 20 mg Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure verabreicht wurde. Zwei Ratten wurden bei normaler Fütterung zehn Tage in den Stoffwechselkäfigen gehalten, wobei Harn und Faeces in Intervallen von 5–10 h zur Aufarbeitung und Aktivitätsbestimmung gelangte (vom dritten Tage an alle 24 h).

2. Ergebnisse

Die in je 20 mg Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure an die Versuchstiere 1 und 2 applizierte Radioaktivität betrug $18,91 \cdot 10^6$ respektive $20,25 \cdot 10^6$ c/min. Die Werte der in den einzelnen Harnfraktionen wieder aufgefundenen Aktivitäten sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengestellt. Harnfraktionen wurden bis zur 240. Stunde gesammelt, doch wurde auf die Bestimmung der

Aktivitäten dann verzichtet, als diese praktisch auf null gesunken waren. Dies war nach 45 respektive nach 48 h der Fall. Die erste Harnfraktion konnte nach 6,6 bzw. 5,6 h erhalten werden.

Tabelle 9

Im Harn ausgeschiedene Aktivität (0–45 h) bei Tier 1

Zeit h	Aktivität c/min	Aktivität ‰	Summe ‰
6,6 h	4,8 · 10 ⁶	25,4 ‰	25,4 ‰
11,0 h	10,3 · 10 ⁶	54,5 ‰	79,9 ‰
20,5 h	0,36 · 10 ⁶	1,90 ‰	81,8 ‰
29,5 h	0,12 · 10 ⁶	0,63 ‰	82,4 ‰
34,8 h	0,08 · 10 ⁶	0,42 ‰	82,9 ‰
44,7 h	0,006 · 10 ⁶	0,03 ‰	82,9 ‰

Tabelle 10

Im Harn ausgeschiedene Aktivität (0–48 h) bei Tier 2

Zeit h	Aktivität c/min	Aktivität ‰	Summe ‰
5,6 h	5,37 · 10 ⁶	26,5 ‰	26,5 ‰
15,1 h	10,62 · 10 ⁶	52,5 ‰	79,0 ‰
24,1 h	0,398 · 10 ⁶	1,96 ‰	81,0 ‰
29,4 h	0,133 · 10 ⁶	0,65 ‰	81,6 ‰
39,2 h	0,169 · 10 ⁶	0,84 ‰	82,5 ‰
48,1 h	0,034 · 10 ⁶	0,17 ‰	82,6 ‰

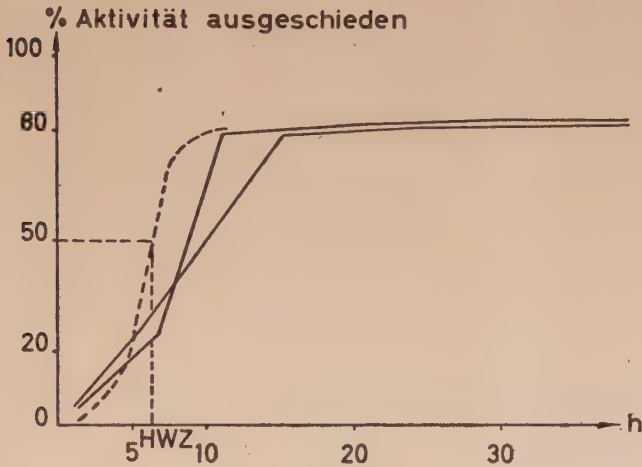
Durch graphische Darstellung dieser Tabellen erhalten wir die in Figur 1 abgebildete Ausscheidungskurve von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure. Die ausgezogenen Linien bilden die Verbindungsgeraden der für die beiden Versuchstiere gefundenen Ausscheidungswerte. Die unterbrochene Linie dürfte den mutmasslichen Verlauf der Ausscheidung in den ersten Stunden darstellen. Der in den 15-stündigen Verteilungsversuchen erhaltene Wert von rund 80 ‰ ist bereits nach etwa 10 h erreicht und wird nur noch um wenige Prozente überschritten. Nach ca. 30 h findet praktisch keine weitere Ausscheidung mit dem Harne mehr statt.

Aus der Kurve ergibt sich eine biologische Halbwertszeit (HWZ) von 6–8 h.

Für die Bestimmung der vollständigen Ausscheidung des Pharmakons aus dem Organismus müssen zu den Harnwerten die in den Faeces aufgefundenen Aktivitätswerte addiert werden. Da vom zweiten Tage an kein Aktivitätsgehalt der Faeces mehr zu erwarten war, wurden die Fraktionen des 2.–10.

Figur 1

Ausscheidung von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure im Harn



Tages vereinigt und die Aktivität der Sammelfraktion bestimmt. Die Aktivitätswerte der Faeces sind in Tabelle 11 aufgeführt, die totalen Ausscheidungswerte in Tabelle 12.

Tabelle 11

In den Faeces ausgeschiedene Aktivität

Zeit h	Tier 1		Tier 2	
	Aktivität c/min	Aktiv. %	Aktivität c/min	Aktiv. %
0 – 30 h	$1,24 \cdot 10^6$	6,58	$0,541 \cdot 10^6$	2,54
30 – 240 h	0	0	0	0

Tabelle 12

Totale Ausscheidung nach 45–48 h in % der applizierten Aktivität

	Tier 1	Tier 2
Harn	82,9 %	82,6 %
Faeces	6,6 %	2,5 %
total	89,5 %	85,1 %

Die Aktivitätswerte der Faeces nach 30 h sind also nicht viel höher als nach 15 h. Für die biologische Halbwertszeit fallen sie kaum ins Gewicht.

Bei Tier 1 wurde nach dem 10-tägigen Versuch die verbleibende Aktivität der wichtigsten Organe und des Carcass bestimmt. Diese Werte und ihr Vergleich mit den nach 15 h erhaltenen, zeigen die Tabellen 13 resp. 14.

Tabelle 13
Verteilung der Aktivitäten auf die einzelnen Körperteile
(Tier 1 nach 240 h)

	Aktivität in c/min		Aktivität in ‰	
	Lipid	Rückstand	Lipid	Rückstand
Leber	$0,013 \cdot 10^6$	0	0,007	0
Niere	$0,018 \cdot 10^6$	$0,015 \cdot 10^6$	0,10	0,08
Magen-Darmtractus incl. Inhalt	$0,050 \cdot 10^6$	$0,358 \cdot 10^6$	0,27	1,96
Carcass	0	0	0	0

Tabelle 14
Abnahme der Aktivitäten in den Organen von 15 bis 240 h

	Aktivität in ‰	
	15 h	240 h
Leber	0,22	0,07
Niere	0,26	0,18
Magen-Darmtractus incl. Inhalt	8,52	2,23

Tabelle 15 zeigt schliesslich die Gesamtbilanz der Aktivität von Tier 1 nach 10 Tagen (Vergleiche dazu Tabelle 8).

Tabelle 15
Aktivitätsbilanz von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure
nach 240 h bei der Ratte

Harn	82,9 ‰	
Faeces	6,6 ‰	
Ausscheidung total		89,5 ‰
Leber	0,07 ‰	
Niere	0,18 ‰	
Magen-Darmtractus incl. Inhalt	2,23 ‰	
Organe + Darminhalt tot.		2,48 ‰
Carcass	0 ‰	0 ‰
	91,98 ‰	91,98 ‰

3. Diskussion der Ergebnisse

a) Während die Ausscheidung der Aktivität im Harn nach 240 h ungefähr gleich gross ist wie nach 15 h, erhöht sich die Ausscheidung mit den Faeces um einige Prozente. Es findet eine entsprechende Abnahme der Aktivität des Darminhaltes statt.

b) Die in den Organen aufgefundenen Aktivitäten waren durchwegs noch geringer als die nach 15 h ermittelten Werte. Wie zu erwarten war, konnte im Carcass keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Eine Retention oder Akkumulation von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure im Organismus oder einzelnen Organen findet daher eindeutig nicht statt.

c) Der relative Fehler der ermittelten Aktivitätswerte dürfte zwischen 5 und 10 % liegen, wobei wohl nur zu tiefe, kaum jedoch zu hohe Werte gefunden werden. Dafür sprechen die Aktivitätsbilanzen, welche nur 90 bis 95 % der applizierten Aktivität erreichen, ferner etwa Tabelle 6. Dieser Fehler macht sich besonders bei den hohen Harnwerten bemerkbar, was bedeutet, dass die in den Bilanzen fehlenden Aktivitäten hauptsächlich auf die Harnausscheidung übertragen werden dürften. Wir kommen damit zum Resultat, dass Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure einige Tage nach der Applikation nur noch zu etwa 2 % im Organismus (vor allem im Magen-Darm-tractus) vorliegt, während die restlichen ca. 98 % den Körper durch die Ausscheidungsorgane verlassen haben.

4. Experimentelles

Die experimentellen Arbeiten wurden im allgemeinen gleich ausgeführt wie bei den kurzfristigen Stoffwechselversuchen. Die Tiere wurden während der zehn Versuchstage normal gefüttert und hatten stets Trinkwasser zur Verfügung. Die Faeces wurden möglichst quantitativ entfernt, die Stoffwechselkäfige täglich gereinigt und das Spülwasser mit dem Harn vereinigt.

C. Ausscheidung mit der Galle

1. Methode

Als Versuchstiere wurden wiederum weisse Ratten verwendet. Es wurde ihnen auf operativem Wege eine Fistel in den ductus choledochus eingesetzt, welche die sezernierte Galle quantitativ nach aussen ableitet. Zur Aufrechterhaltung einigermaßen physiologischer Bedingungen wurde dem Tier zusätzlich eine Pylorusfistel eingesetzt, welche mit der Gallenfistel eines zweiten Tieres (Donator) verbunden wurde, und somit den Gallenverlust kompensierte^{82,83}.

Nach peroraler Verabreichung von signierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure an das Versuchstier (Acceptortier) wurden Galle und Exkrete gesammelt und deren Radioaktivitäten periodisch bestimmt. Die Gallenfisteltiere wurden in speziellen Käfigen gehalten, welche nur wenig Bewegung erlauben und somit Fistel und Operationsnarbe vor Verletzung bewahren.

2. Ergebnisse

Dem Versuchstier wurden 20 mg Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure, enthaltend $8,20 \cdot 10^6$ c/min, per os appliziert. Das Tier schlief bald, und der Gallenfluss war während der ganzen Dauer des Versuches (48 h) sehr gleichmässig (ca. 1 gr/h).

Die Aktivitätswerte der einzelnen Gallenfraktionen zeigt Tabelle 16. Die Bestimmungen wurden eingestellt, als die Aktivität der Galle praktisch auf den Nullwert abgesunken war. Dies war nach 9–10 h der Fall.

Tabelle 16

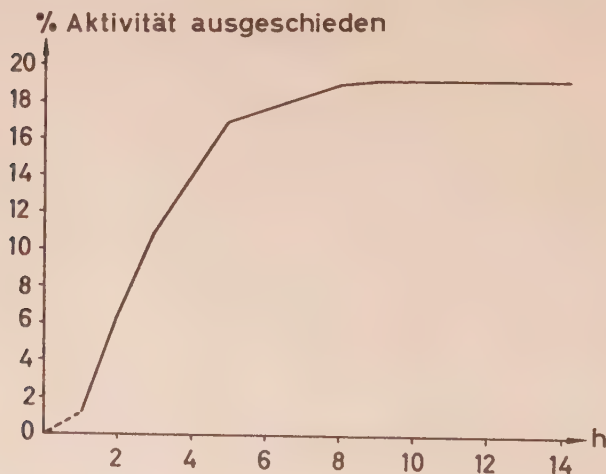
Mit der Galle ausgeschiedene Radioaktivität

Zeit h	Aktivität c/min	Aktivität ‰	Summe ‰
0 – 1	$0,102 \cdot 10^6$	1,25	1,25
1 – 2	$0,424 \cdot 10^6$	5,16	6,41
2 – 3	$0,369 \cdot 10^6$	4,50	10,91
3 – 5	$0,489 \cdot 10^6$	5,96	16,87
5 – 8	$0,168 \cdot 10^6$	2,05	18,92
8 – 9	$0,013 \cdot 10^6$	0,16	19,08
9 – 14	$0,005 \cdot 10^6$	0,06	19,14

Figur 2 zeigt die graphische Darstellung der Tabelle 16, d. h. den zeitlichen Verlauf der Aktivitäts-Ausscheidung mit der Galle.

Figur 2

Ausscheidung der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure mit der Galle



Die Versuchsanordnung brachte es mit sich, dass die gesammelten Faeces oft mit Harn in Berührung standen und daher zu hohe Aktivitätswerte lieferten. Sinnvoll ist daher nur die Angabe der Summe von in Harn und Faeces wiederaufgefundener Aktivität, wie sie in Tabelle 17 dargestellt ist. Tabelle 18 zeigt die Gesamtbilanz der Ausscheidungen.

Tabelle 17
Mit Harn und Faeces ausgeschiedene Aktivität

Zeit h	Aktivität c/min	Aktivität %
0 – 24	$5,70 \cdot 10^5$	69,5
24 – 48	$0,659 \cdot 10^6$	8,04
total	$6,359 \cdot 10^6$	77,5

Tabelle 18
*Bilanz der Ausscheidungen bei der Gallenfistelratte in %
der applizierten Aktivität*

Harn und Faeces	77,5 %
Galle	19,1 %
Total	96,6 %

3. Diskussion der Ergebnisse

Der Versuch wurde nur an einem Fistel-Tier durchgeführt. Wesentlich ist das qualitative Ergebnis, dass Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure resp. sein Abbauprodukt mit der Galle zu einem gewissen Ausmass von der Leber in den Dünndarm zurückgeleitet wird. Der Anteil des Pharmakons, der diesen Weg geht, dürfte mit rund 20 % angegeben werden.

Die Ausscheidung mit der Galle ist nach ca. 9 h beendet. Dies stimmt mit der Harnausscheidung sehr gut überein, welche nach 10–12 h praktisch beendet ist.

Da der nach 15 h bestimmte Aktivitätsgehalt des Darminhaltes weniger als 10 % beträgt (Tabelle 3) und dies, nachdem durch die Galle ca. 20 % in den Darm gelangt sind, muss auf eine Rückresorption geschlossen werden. Es liegt also im Metabolismus der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure ein Gallenkreislauf vor. – Soweit wir die Literatur überblicken konnten, wurden Barbiturate noch nie auf ihre Ausscheidung mit der Galle untersucht. Als Vergleich diene daher das Hynoticum α -Phenyl- α -äthyl-glutaramid (Doriden), welches nach Untersuchungen von Bernhard, Just und Vuilleumier⁸² während 35–45 h zu ca. 70 % mit der Galle zur Ausscheidung gelangt.

4. Experimentelles

Das Prinzip der Operationstechnik haben *Bernhard und Mitarbeiter*^{82,83} beschrieben. – In einer 48stündigen postoperativen Erholungsphase, in der Gallen- und Pylorusdrain „kurzgeschlossen“ waren, erhielten die Tiere subcutane Injektionen von Ringer-Lösung und Vitamin K. Von der 24. Stunde an wurden sie normal gefüttert. Der Gallenfluss war normal.

48 h nach der Operation wurde dem Acceptortier die Lösung des Cycloheptenyl-äthyl-barbiturates direkt durch den Pylorusdrain in den Magen eingespritzt. Darauf wurde die Pylorusfistel mit der Gallenfistel des Donatorieres verbunden, dessen Käfig ca. 20 cm über demjenigen des Acceptortieres fixiert war. Die Galle wurde fraktionsweise gesammelt und alkalisch im Kühlschrank aufbewahrt. Der Versuch dauerte 48 h. Darauf wurden die Drains des Acceptortieres wieder „kurzgeschlossen“ und die Tiere zu Beobachtungszwecken weiter am Leben erhalten.

Zur Aktivitätsbestimmung der Gallenfraktionen wurden je 30–40 mg Galle im Exsikkator eingedunstet und der Mikroverbrennung unterworfen.

IV. METABOLISMUS DER 5,5-CYCLOHEPTENYL-ÄTHYL-BARBITURSÄURE

Wegleitend für die Aufklärung des Stoffwechsels der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure waren die Resultate der Verteilungs- und Ausscheidungsversuche (Kap. III). Da es sich dabei erwiesen hatte, dass 80–90 % der applizierten Radioaktivität auf renalem Weg ausgeschieden werden, mussten Metaboliten in erster Linie im Harn nachgewiesen und aus diesem isoliert werden. In Ergänzung dazu wurde auch Galle und Faeces zu analogen Untersuchungen herangezogen, während bei den Organen und Körperteilen wegen der unbedeutenden Konzentrationen darauf verzichtet werden konnte.

A. Ergebnisse und Diskussionen

1. Verteilung der Metaboliten in Harn, Galle, Faeces

Die wichtigste Nachweismethode für Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure und ihre Metaboliten bildete die Papierchromatographie. Vorstudien auf Grund von Literaturangaben^{84, 17–24} führten uns zu einer brauchbaren Methode unter Verwendung von Isopropanol, Chloroform und Ammoniak als Lösungsmittel und Sichtbarmachung mit KMnO_4 . Nach Gaben der signierten Verbindung wurde die Aktivitätsverteilung auf den Radiochromatogrammen und damit die Lage der radioaktiven Metaboliten bestimmt. Unter solchen Bedingungen zeigte die radiochromatographische Aufnahme des Rattenharnes in jedem Falle zwei starke Maxima und zwei Stellen leicht erhöhter Radioaktivität (Fig. 3). Die an zwei Radiochromatogrammen ermittelte Verteilung der Metaboliten im Harn zeigt Tabelle 19.

Figur 3

Chromatographische Verteilung der Radioaktivität in Rattenharn nach Gaben von ^{14}C -Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure

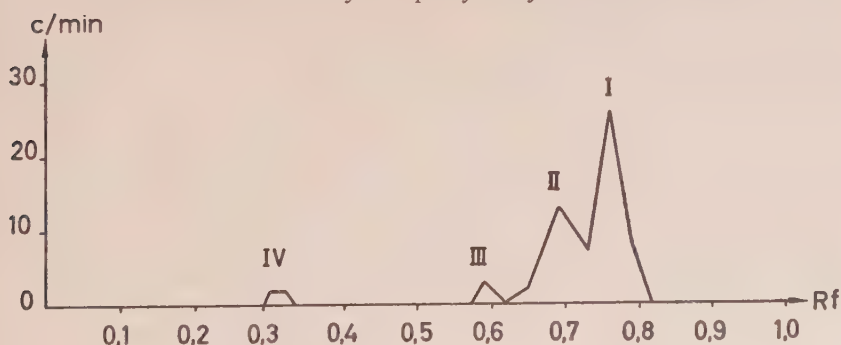


Tabelle 19

Lage und Verteilung der Metaboliten im Harn von Ratten

Bezeichnung	Rf		c/min		% Verteilg.		% Verteilg.
	I	II	I	II	I	II	Mittel
Metabolit I	0,76	0,74	68	108	52	53	52,5 %
Metabolit II	0,69	0,68	44	60	34	30	32 %
Metabolit III	0,59	0,58	5	12	4	6	5 %
Metabolit IV	0,31	0,30	5	8	4	4	4 %
							= 93,5 %

Bemerkungen: Die in der Kolonne c/min angegebenen Werte bilden die Summe der auf den einzelnen Metabolitenbereichen gemessenen Radioaktivitäten. Die prozentuale Verteilung bezieht sich auf die gesamte auf den Chromatogrammen bestimmte Aktivität. Der in der Summe fehlende Betrag von 6–7 % entspricht der zerstreuten, nicht in Metabolitenbereichen liegenden Aktivität.

Diskussion: Die Radiochromatogramme von Harn nach Verabreichung von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure zeigen eindeutig zwei Hauptmetaboliten I und II. Mit KMnO_4 behandelte Chromatogramme zeigen bei denselben Rf-Werten je einen braunen spot, wobei die Intensität des vorderen (Metabolit I) grösser ist. Auch die Übereinstimmungen der einzelnen Chromatogramme sind gut (vergl. z. B. Tabelle 19). Zur Ermittlung des Verhältnisses der beiden Hauptmetaboliten dienten drei Radiochromatogramme (Tabelle 20).

Tabelle 20

Verhältnis der Metaboliten I und II im Harn von Ratten

	I	II	III	Mittel
Metabolit I	60,7 %	64,3 %	63,4 %	62,8 %
Metabolit II	39,3 %	35,7 %	36,6 %	37,2 %

Die Radioaktivitäten bei den Rf-Werten 0,59 und 0,30 sind ungleich geringer als diejenigen der beiden Hauptmetaboliten. Ihre absoluten Werte lagen bei unserer Versuchsanordnung nur wenig über den Nullwerten und über den minimalen Zufallsaktivitäten. Im Gegensatz zu diesen finden sich jedoch die beiden obigen Aktivitätsmaxima in Harnchromatogrammen regelmässig, so dass an der Existenz der Metaboliten III und IV nicht zu zweifeln ist.

Harn, welcher während acht Tagen an der Luft gestanden, also bakterielle Zersetzung erfahren hatte, zeigte dieselbe Aktivitätsverteilung wie frischer Harn. Die Metaboliten der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure erfahren also – im Gegensatz zum Veronal¹⁶ – keine sekundären Veränderungen.

In Ergänzung zu diesen Befunden wurde ein Radiochromatogramm von Rattengalle aufgenommen. Die nach Verabreichung aktiver Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure an einem Gallenfisteltier gewonnene Galle zeigte folgende Aktivitätsverteilung:

Je ein ausgeprägtes Maximum gleicher Intensität in den Rf-Bereichen um 0,70 und 0,35; dazwischen eine Zone gleichmässig erhöhter Aktivität.

Das erste Maximum dürfte die Metaboliten I und II (möglicherweise auch III) repräsentieren, das zweite sehr wahrscheinlich den im Harn nur in geringer Menge vorkommenden Metaboliten IV. Das mit KMnO_4 behandelte Chromatogramm zeigte einen einzigen spot vom Zentrum Rf 0,70. Die schlechte Auftrennung des Gallenchromatogramms erlaubte keine quantitative Bestimmung der Metabolitenverteilung. Ein mit n-Propanol/Ammoniak entwickeltes Radiochromatogramm zeigte quantitativ dasselbe Bild.

Schliesslich wurde noch die Metabolitenverteilung in den Faeces studiert. Nach Verabreichung von signierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wurden die Faeces mit Äthanol extrahiert und der Extrakt chromatographiert. Das Radiochromatogramm zeigte ein starkes Maximum bei Rf 0,72 (Metabolit I) und je ein schwaches bei den Rf-Werten 0,66, 0,54 und 0,3. Die Metaboliten II, III und IV liegen also in den Faeces ebenfalls vor.

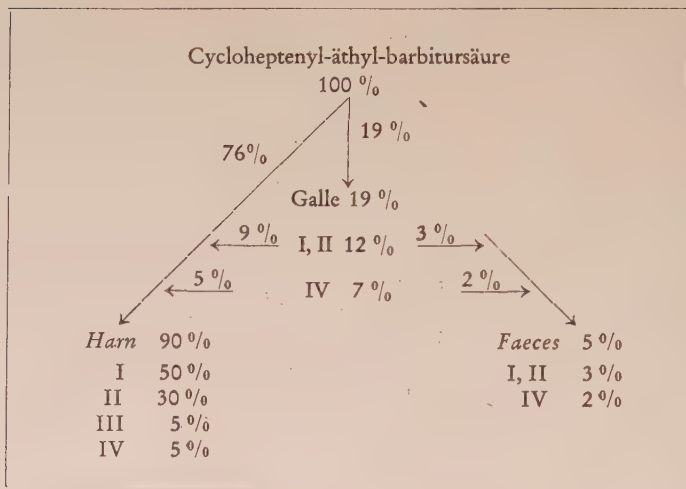
Die mit Äthanol extrahierten Faeces wurden anschliessend einer Extraktion mit Wasser unterworfen. Das Radiochromatogramm dieses wässrigen Extraktes zeigte zwei deutliche Aktivitätsmaxima bei Rf 0,70 und 0,30, dazwischen eine Zone leicht erhöhter Radioaktivität. Beim ersten Maximum dürfte es sich um die Metaboliten I und II handeln, beim zweiten, etwas stärkeren, um Metabolit IV. Eine quantitative Bestimmung der Verteilung liess sich auch hier infolge der ungenügenden Trennschärfe nicht durchführen. Die absoluten Aktivitätswerte waren gering.

Wichtig ist schliesslich die Feststellung, dass Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure, deren Rf-Wert 0,80–0,86 beträgt, weder im Harn noch in der Galle nachgewiesen werden konnte. Aktivitätserhöhungen oder KMnO_4 -spots traten in Harnchromatogrammen von Ratten, Hunden und Menschen nicht auf. Einzig im äthanolischen Faecesextrakt könnte eine leicht erhöhte Aktivität im fraglichen Bereich als Spuren nicht resorbierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure gedeutet werden. Jedenfalls wird das resorbierte Pharmakon nicht unverändert ausgeschieden.

Unter Verwendung der Resultate der Verteilungsversuche in den Kapiteln III und IV ist das in Figur 4 wiedergegebene Verteilungsschema von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure diskutierbar.

Figur 4

Schema des Metabolismus der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure bei der Ratte



2. Metabolit I

Im selben Rf-Bereich wie das Aktivitätsmaximum von Metabolit I konnte durch Behandlung der Chromatogramme mit KMnO_4 stets ein brauner spot erhalten werden, der jedoch im Normalharn (ohne Verabreichung von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure) niemals auftrat. Der spot wurde im metabolithaltigen Harn von Ratten, Hunden und Menschen gleichermassen erhalten.

Derselbe spot trat auf beim Chromatographieren von rohen Äther- und Essigesterextrakten von angesäuertem Hundeharn, gewonnen nach Verabreichung von unsignierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure. Bei Zusatz von Wasser zur äthanolischen Extraktlösung liess sich gelbbraunes Material auskristallisieren, das durch Behandlung mit Tierkohle und Umkristallisieren aus Wasser-Äthanol oder Wasser zu weissen Kristallen vom Schmelzpunkt $212\text{--}217^\circ\text{C}$ gereinigt werden konnte.

Nachdem damit die Wahrscheinlichkeit der Identität mit dem von *R. Pulver* gefundenen Metaboliten der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure⁴¹ nahegelegt war, wurde das von diesem Autor beschriebene Isolierungsverfahren benützt. Zufolge der relativ geringen Ätherlöslichkeit des Metaboliten verlängerten wir die Extraktionsdauer erheblich und erhielten eine bessere Ausbeute. Bezogen auf die Menge der applizierten Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure betrug sie beim Hund rund 30 %. Versuche bei Extraktion von Harn, der radioaktive Metaboliten enthielt, zeigten, dass nur ca. 3 % der Aktivität in

der wässrigen Phase zurückbleiben. Die Extraktionsausbeute ist daher sehr gut, während die Verluste bei der nachfolgenden Isolierung liegen müssen.

Der isolierte Metabolit I erwies sich in allen Fällen als chromatographisch rein. Wichtig ist vor allem die völlige Trennung vom chromatographisch benachbarten Metaboliten II.

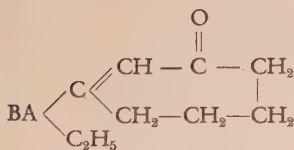
Metabolit I bildet weisse Nadeln, die unter Sublimation bei 214–217°C schmelzen. Die Löslichkeit ist gut in Alkohol und heissem Wasser, schlecht in kaltem Wasser.

Die spektroskopischen Messungen erlaubten folgende Deutungen:

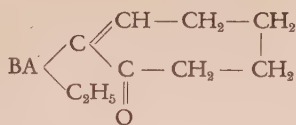
Der Vergleich des IR-Spektrums mit demjenigen von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure zeigt primär das Vorliegen eines Barbitursäurederivates. Neue Banden treten bei Metabolit I auf bei 6,10 und 6,16 μ (Nujolverreibung) resp. 5,98 μ (Dioxan), wobei es sich um C=O- und C=C-Valenzschwingungen handeln dürfte. Ihre Intensität ist niedriger als zu erwarten wäre. – Eine weitere Bande zeigt Metabolit I bei 2,88 μ (Nujol) resp. 2,91 μ (Dioxan), die als OH-Valenzschwingung vermutet werden könnte. – Die Häufung funktioneller Gruppen erschwert die Interpretation von Spektren derartiger Barbitursäurederivate.

Das UV-Spektrum von Metabolit I zeigt eine Schulter bei 230 m μ , welche bei Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure fehlt. Durch Differenzbildung findet man für die neue Gruppe ein Maximum von 231 m μ , wonach ein konjugiertes System C=C-C=C oder C=C-C=O vorliegt. Die Intensität ist geringer als sie zu erwarten wäre.

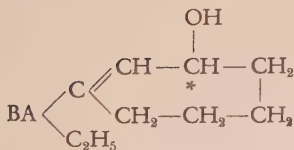
Mikroanalyse und Spektren legen für die Konstitution des Metaboliten I eine im 7-Ring oxydierte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure nahe. Die grösste Wahrscheinlichkeit kommt dabei den Ketonen A und B zu, doch fällt auch der Alkohol C in Betracht. (BA=Barbitursäure).



A



B



C

Die C-H-Bestimmung stimmt für das Keton besser als für den Alkohol (Tabelle 21), doch dürften die berechneten Werte zu nahe liegen, um eine klare Zuordnung zu einer der beiden Verbindungen zu erlauben. Ausge-

geschlossen ist die Anwesenheit beider Oxyfunktionen am Molekül, da dies in den Analysenwerten klar zur Geltung käme.

Tabelle 21
Berechnete und gefundene Analysenwerte

Keton	A, B	(Berechnet)	C: 59,08 %	H: 6,10 %	N: 10,60 %
Alkohol	C	(Berechnet)	58,63 %	6,81 %	10,52 %
Metabolit	I	(Gefunden)	59,02 %	6,38 %	10,68 %

Während der Alkohol C ein asymmetrisches Zentrum*) aufzuweisen hätte, erwies sich Metabolit I als optisch inaktiv. – Ebenso wenig gelang der Nachweis der allfälligen OH-Gruppe durch Veresterung: Metabolit I, der dem Acetylierungsprozess unterworfen wurde, zeigte fast unveränderte Eigenschaften und das IR-Spektrum war praktisch identisch mit demjenigen von Metabolit I.

Zur Bestätigung der Carbonylgruppe wurde der Metabolit I mit Semicarbazid behandelt. Im Gegensatz zum Parallelversuch mit Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure trat ein Niederschlag von Semicarbazon auf. Der Schmelzpunkt der farblosen Kristalle betrug 234–237°C; die Mikroanalyse lieferte folgende Werte von guter Übereinstimmung mit den für das Semicarbazon des Ketons A, B geforderten Werten:

Berechnet:	C: 52,33 %	H: 5,96 %	N: 21,80 %
Gefunden:	52,37 %	6,08 %	21,78 %

Unsere Befunde bestätigen demnach das von R. Pulver⁴¹ auf Grund von Analyse und Semicarbazon gewonnene Ergebnis, dass es sich bei diesem Metaboliten um Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure handelt. – Die Identität des Metaboliten von R. Pulver mit dem von uns isolierten Metaboliten I bestätigt sich auch im direkten Vergleich (Misch-Schmelzpunkt, Semicarbazone etc.).

Zur Bestätigung der Struktur des Metaboliten I wurde auch die biologische Oxydation von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure in vitro zu reproduzieren versucht. Selendioxyd führte jedoch auch bei weiter Variation der Reaktionsbedingungen zu keiner Veränderung der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure. CrO₃ in Eisessig führte dagegen zu einem oxydativen Abbau des Moleküls.

Auffallend ist die relativ leichte Hydrolysierbarkeit der Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure. Aus metabolithaltigem, sauer verseiftem Harn lässt sich kein Metabolit I mehr isolieren, und reiner Metabolit wird bei der Behandlung mit äthanolischer HCl zu Spaltprodukten vom Schmelzpunkt 60–70°C abgebaut. Dem gegenüber erleidet Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure bei derselben Behandlung keine Veränderung.

Wesentlich erschien uns eine quantitative Bestimmung des Metaboliten I. Da unsere Isolierung sicher nicht quantitativ war, wurde die Isotopenverdünnungsmethode herangezogen.

Zwei Hunden wurden je 0,800 gr unsignierte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure verabreicht. Zum während 48 Stunden gesammelten Harn wurden je 0,215 gr reiner ^{14}C -signierter Metabolit I (enthaltend $2,40 \cdot 10^6$ c/min) in Lösung zugesetzt und aus den Harnen wie üblich der Metabolit I isoliert. Aus der Abnahme der spezifischen Aktivität (Isotopenverdünnung durch entstandenen inaktiven Metaboliten I) errechnet sich die Menge des physiologisch in den Harn gelangten Metaboliten I (Tabelle 22).

Tabelle 22

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Metabolit I-Ausscheidung beim Hund durch Isotopenverdünnung

1) Hund R. (♂):	Aktivität	Spez. Akt. c/min mg
800 mg C.H.B.* inakt. ↓ Biosynthese x mg Met. I inakt. } Harn + 215 mg Met. aktiv } ↓ Isolierung 240 mg Met. I aktiv ↓ Reinigungen 141 mg Met. I aktiv	 $2,40 \cdot 10^6$ c/min	 $11,17 \cdot 10^3$ $4,265 \cdot 10^3$
2) Hune S. (♀):	Aktivität	Spez. Akt. c/min mg
800 mg C.H.B.* inakt. ↓ Biosynthese x mg Met. I inakt. } Harn + 215 mg Met. aktiv } ↓ Isolierung 258 mg Mt. I aktiv ↓ Reinigungen 173 mg Met. I aktiv	 $2,40 \cdot 10^6$ c/min	 $11,17 \cdot 10^3$ $4,075 \cdot 10^3$

*C.H.B. = Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure (appliziert)

Aus den gefundenen Aktivitäten ergeben sich folgende Ausscheidungsmengen von Metabolit I:

1. *Hund R.:*

$$x + 215 \text{ mg} = \frac{2,40 \cdot 10^6 \text{ c/min}}{4,265 \cdot 10^8 \text{ c/min mg}} = 562 \text{ mg}$$

$$x = 562 - 215 = 347 \text{ mg Met. I physiologisch gebildet.}$$

$$\frac{347 \text{ mg}}{800 \text{ mg}} = 43,4 \% \text{ Metabolit I (bezogen auf C.H.B.)}$$

2. *Hund S.:*

$$x + 215 \text{ mg} = \frac{2,40 \cdot 10^6 \text{ c/min}}{4,075 \cdot 10^8 \text{ c/min mg}} = 588 \text{ mg}$$

$$x = 588 - 215 = 373 \text{ mg.}$$

$$\frac{373 \text{ mg}}{800 \text{ mg}} = 46,6 \% \text{ Metabolit I}$$

Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wird daher beim Hund zu ca. 45 % in Form von Metabolit I (Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure) im Harn ausgeschieden.

Dieses Resultat zeigt gute Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei der Ratte. Bei einer Aktivitätsausbeute im Harn von ca. 90 % (s. III) und einem radiochromatographischen Aktivitätsanteil für Metabolit I von 52,5 % (Tabelle 18) ergäbe sich ein Ausscheidungswert im Harn von $0,9 \cdot 0,525 = 47 \%$.

In Ergänzung zu den Untersuchungen am Hund wurde eine analoge Versuchsserie zur Bestimmung der Ausscheidung von Metabolit I am Menschen ausgeführt.

Mehreren Versuchspersonen wurde je 0,400 gr Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure (entsprechend zwei Tabletten MEDOMIN) peroral verabreicht und der Harn von 12, 24 oder 36 h quantitativ gesammelt. Nach Zusatz von 10–50 mg Metabolit I von ca. 10^5 c/min zum Harn wurde der Metabolit nach üblichem Verfahren isoliert, gereinigt und die neue spezifische Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie zeigt Tabelle 23.

Tabelle 23

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Metabolit I-Ausscheidung beim Menschen durch Isotopenverdünnung

Versuchsperson	Zugesetzter Metabolit I		Isolierte spez. Aktivität c/min mg	Dauer	Metabolit I* im Harn
	mg	Aktiv. c/min			
U. B.	53,8	$5,80 \cdot 10^5$	$5,675 \cdot 10^3$	12 h	12,1 %
M. B.	13,3	$3,45 \cdot 10^5$	$10,38 \cdot 10^3$	12 h	5,0 %
M. B.	43,0	$4,63 \cdot 10^5$	$2,95 \cdot 10^3$	24 h	28,5 %
M. B.	13,3	$3,45 \cdot 10^5$	$4,95 \cdot 10^3$	24 h	14,1 %
K. B.	40,1	$10,35 \cdot 10^5$	$9,18 \cdot 10^3$	36 h	18,2 %

*) bezogen auf applizierte Menge Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure

Gegenüber den an Ratte und Hund gewonnenen entsprechenden Resultaten zeigen diese Ergebnisse beim Menschen in dreifacher Hinsicht wesentliche Verschiedenheit:

1. Die absoluten Werte der Metabolit I-Bildung liegen wesentlich tiefer: Hund, Ratte ca. 45 %; Mensch 15–30 % in 24 h. Auch die Isolierungsausbeuten lagen mit 3–6 % sehr tief.
2. Die individuellen Schwankungen sind sehr beträchtlich.
3. Die Ausscheidung verläuft beim Menschen deutlich langsamer. Während bei der Ratte die Ausscheidung nach 12–15 h praktisch vollständig ist, scheint der Mensch zwischen der 12. und 24. Stunde noch wesentliche Mengen Metabolit I auszuschcheiden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ausscheidung auch nach 24 h nicht sicher abgeschlossen ist.

Diskussion: Die relativ geringe, resp. langsame Ausscheidung bezieht sich nur auf den einen Metaboliten (I); über die weitere Ausscheidung des Pharmakons ist keine oder nur eine partielle Aussage möglich. Die Annahme, einer von der Ratte verschiedenen Metabolitenverteilung, d. h. vermehrter Bildung anderer Metaboliten (II, III, IV oder spezifischer) ist sicher berechtigt. So könnten Paarungsprodukte vorliegen. Auskunft ergäben aber erst analoge Versuche mit isotopensigniertem Pharmakon, worauf wir aber vorerst verzichten mussten.

Die an Ratten und Hunde applizierte Dosis lag eine ganze Größenordnung höher als bei den Menschenversuchen:

Ratte:	80 mg/kg
Hund:	53 mg/kg
Mensch:	6 mg/kg

Damit wäre denkbar, dass der Organismus bei grosser Belastung z. B. mehr Metabolit I bildet und eliminiert. – Ebenso sind Unterschiede bei einmaliger oder wiederholter Verabreichung denkbar. In diese Richtung weist die beobachtete Gewöhnung der Hunde: Nach der zweiten oder dritten Tagesdosis trat die Schlafwirkung nur noch vermindert ein. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von *Spector* und *Shideman*⁸⁷ interessant, welche nach Belastung von Hunden mit Pentobarbital einen Metaboliten zu 12,5 %, bei einmaliger Verabreichung dagegen nur zu 4,8 % isolieren konnten.

Soweit wir die Literatur überblicken, basieren alle Untersuchungen über Stoffwechsel der Barbiturate auf Tierversuchen (Ratte, Kaninchen, Hund). Die wenigen Versuche an Menschen erlauben keine quantitative Auswertung. So hat Pulver⁴¹ an Versuchspersonen ca. 1 % Metabolit I isoliert, während unsere Isotopenverdünnungsversuche Ausscheidungswerte von 15–30 % liefern.

Die obigen Resultate am Menschen, denen im Vergleich zu den ausgedehnten Versuchsreihen insbesondere an der Ratte mehr orientierender Charakter zukommt, weisen jedenfalls auf die Problematik hin, mit welcher die Übertragung der Ergebnisse des Tierversuches auf menschliche Verhältnisse stets behaftet ist.

3. Metabolit II

Das Vorliegen eines zweiten quantitativ bedeutsamen Metaboliten ging eindeutig aus den Radiochromatogrammen der Rattenharn hervor. Metabolit II zeigt ein deutliches Aktivitätsmaximum, resp. einen braunen KMnO_4 -Fleck im R_f -Bereich 0,63–0,70. Bei der Wahl geeigneter Bedingungen erscheinen deutlich zwei getrennte spots für die beiden Hauptmetaboliten. Die papierchromatographischen Befunde waren auch für Metabolit II bei Ratte, Hund und Mensch identisch. Die Färbung des spots war in allen Fällen etwas weniger intensiv als diejenige des Metaboliten I, was mit der mengenmässigen Verteilung übereinstimmt.

Die Isolierung von Metabolit II wurde zuerst mit Hilfe der Mengenchromatographie versucht. Die Methode scheiterte daran, dass im R_f -Bereich des Metaboliten II gefärbte Harnextraktivstoffe abgelagert werden, und dass bei den notwendigen hohen Konzentrationen auch die chromatographische Trennung vom Metaboliten I fragwürdig ist. Zudem ist die Methode quantitativ stark begrenzt.

Die Isolierung hatte also zweckmässig aus dem Ätherextrakt zu erfolgen. Zu diesem Zwecke wurden Hunden mehrere Gramm Cycloheptenyl-äthylbarbitursäure verabreicht, der Gesamtharn bei pH 4–6 der Ätherextraktion unterworfen und aus dem Extrakt wie oben angegeben Metabolit I auskristallisiert. Die Mutterlauge wurde so lange eingeeengt, bis kein Metabolit I mehr ausfiel. Während dieses Prozesses war chromatographisch eine deutliche Anreicherung von Metabolit II festzustellen. Die Mutterlauge war stark gefärbt und zeigte weitere KMnO_4 -spots von tieferen R_f -Werten. Diese zusätzlichen Extraktivstoffe konnten durch Zusätze von Äther, durch mehrmaliges Abkühlen auf unter -50°C und durch Tierkohlebehandlung praktisch quantitativ entfernt werden. Es verblieb eine fast farblose ätherische Lösung enthaltend Metabolit II zusammen mit Metabolit I. Unter Zuhilfenahme der grösseren Ätherlöslichkeit von Metabolit II wurde der Eindampfrückstand mehrmals mit Äther behandelt. Diese, sowie weitere Selektionsversuche mit andern Solventien blieben jedoch erfolglos: Die beiden Metaboliten gingen entweder zusammen oder gar nicht in Lösung.

Unter solchen Voraussetzungen schien eine kontinuierliche Verteilung zwischen zwei Lösungsmitteln nach Craig erfolgreich. Zu diesem Zwecke wurden an zwei Hunde während mehrerer Tage insgesamt 6,0 gr Cycloheptenyl-äthylbarbitursäure verabreicht, der gesammelte Harn sauer mit Äther extrahiert und Metabolit I wie üblich aus dem Ätherextrakt ausgeschieden. Dies wurde so lange aus immer stärker konzentriertem Ätherextrakt fortgesetzt, bis keine Kristallisation mehr zu erzwingen war. Dabei zeigte sich erstmalig, dass die drei letzten Kristallfraktionen auch Metabolit II enthielten. Eine Trennung des festen Metabolitgemisches durch Anwendung verschiedener Lösungsmittel, Umkristallisationen etc. gelang ebenso wenig wie mit Ätherextrakten. Aus der konzentrierten Mutterlauge des Ätherextraktes konnte durch Tierkohlebehandlungen und Ätherverdünnungen nur wenig Verun-

reinigung entfernt werden; sie verblieb tiefbraun gefärbt. Da in ihr die Hauptmenge des Metaboliten II festgestellt wurde, musste sie zur Craig-Verteilung mitbenützt werden, zusammen mit den kristallisierten, kaum gefärbten Mischfraktionen.

Als Lösungsmittel für die Gegenstromverteilung diente das in der Papierchromatographie verwendete Gemisch, welches durch erhöhten Wasserzusatz zweiphasig gemacht wurde.

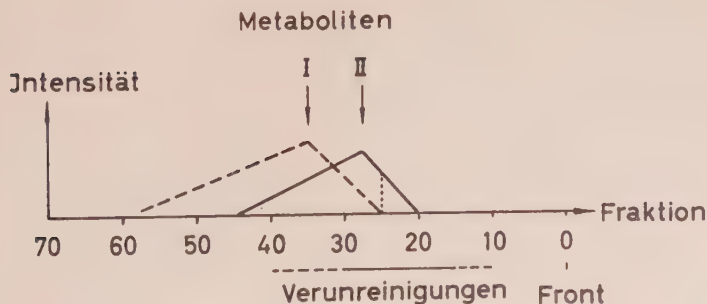
Die Craig-Verteilung des Metabolitengemisches erfolgte im vollautomatischen Apparat über 200 Stufen. Alle 200 Fraktionen wurden separat gesammelt und die Anwesenheit der Metaboliten papierchromatographisch geprüft.

Befund: Die Metaboliten waren relativ frontläufig und fanden sich im Bereiche der Fraktionen 20–60 (Front = Fraktion 1). Weiter vorn und hinten konnten keine Metaboliten mehr festgestellt werden, ebenso wenig in den Unterphasen. Die papierchromatographische Aufnahme zeigte, dass die Wanderungsgeschwindigkeit für Metabolit II etwas grösser war als für Metabolit I, dass jedoch ein Trenneffekt der beiden Metaboliten nur in geringem Ausmasse vorhanden war. Figur 5 zeigt die Verteilung und den Trenneffekt der Metaboliten in den Fraktionen 20–60 (die Intensitäten sind nach den Chromatogramm-spots geschätzt).

Demnach enthalten die Fraktionen 60–45 Metabolit I, 45–25 das Gemisch und nur in den Fraktionen 25–20 ist Metabolit II allein feststellbar, jedoch offensichtlich in sehr geringer Menge. Nachteilig ist ferner der Umstand, dass die gefärbten Harnbestandteile aus dem Ätherextrakt in den Fraktionen 15–30, also zusammen mit dem Metaboliten II abgelagert wurden. Die übrigen Fraktionen waren praktisch farblos.

Zur Isolierung von Metabolit II wurden die Fraktionen 20 bis 25 vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Eine Reinisolierung war davon abhängig, ob es gelang die gefärbten Harnbestandteile und die Salze abzutrennen. Dies gelang weitgehend durch Tierkohle-Behandlung, Entsalzung mit absolutem

Figur 5
Verteilung und Trennung der Metaboliten I und II
durch Craig-Verteilung



Äthanol und Abscheidung von gefärbten Verunreinigungen in wässriger Lösung in der Kälte. Alle Waschflüssigkeiten und Abfallfraktionen (Tierkohle, Salze, Rückstände) wurden papierchromatographisch geprüft und enthielten höchstens spurenweise Metabolit II.

Die rohe Metabolitfraktion enthielt bei 160–220°C sublimierendes neben hochschmelzendem Material ($> 250^{\circ}\text{C}$). Da verschiedene Barbiturate, so auch Metabolit I, sublimierbar sind, war es wahrscheinlich, dass der sublimierende Anteil der Fraktion den Metaboliten II darstellte. Damit empfahl sich als Reinigungsmethode des Rohproduktes die Sublimation. Der Rohmetabolit wurde im Hochvakuum der Sublimation unterworfen. Eine erste Fraktion sublimierte bei ca. 110–140°C und erwies sich als Ammoniumchlorid. Um 200°C sublimierte eine zweite Fraktion. Eine dritte Steigerung bis 250°C lieferte praktisch kein Sublimat mehr. Als Rückstand verblieb sehr wenig dunkelbraune, ungeschmolzene Masse. – Die zweite Fraktion enthielt ebenfalls NH_4Cl , doch war papierchromatographisch auch der Metabolit II festzustellen und zwar ohne die bekannten Verunreinigungen oder Metabolit I. Die Analyse der Fraktion lieferte 15,88 % C, 7,38 % H, 21,12 % N, welches Resultat für ein Gemisch von 25 % Metabolit II und 75 % Ammoniumchlorid genau zuträfe (für gleiche Bruttoformeln der Metaboliten I und II). Dieses Resultat bestätigte qualitativ auch ein Vergleich der Schmelzbilder von Ammoniumchlorid und der verunreinigten Metabolitfraktion. Im IR-Spektrum drang die organische Komponente kaum mehr durch; im UV-Spektrum zeigte sich ihr Anteil (Maximum 260 m μ) als eher unter 25 % liegend.

Nachdem das beschriebene Verfahren somit das Hauptproblem, nämlich die Abtrennung des Metaboliten II vom Metaboliten I gelöst hat, scheiterte die Reindarstellung des ersteren daran, dass für die letzte Reinigungsoperation (Abtrennung von NH_4Cl) nur noch wenige mg Substanz zur Verfügung standen.

Unsere langwierigen Trennungs- und Isolierungsverfahren mit dem Metaboliten II geben immerhin einigen Einblick in dessen mögliche Konstitution. Alle Befunde deuten auf eine sehr nahe chemische Verwandtschaft der beiden Hauptmetaboliten. Im Rf-Wert und in der Ätherlöslichkeit lagen in unsern Versuchen die einzigen, wenn auch äusserst geringen, manifest gewordenen Unterschiede. Nach der Extrahierbarkeit in saurem Milieu und der Löslichkeit in Alkalien muss es sich beim Metaboliten II ebenfalls um eine Säure handeln. Zusammen mit den übrigen mit Metabolit I gemeinsamen Eigenschaften hat ein Derivat der Barbitursäure alle Wahrscheinlichkeit für sich. Sehr wahrscheinlich ist auch die durch Reduktion von KMnO_4 zu Braunstein indizierte Doppelbindung die unveränderte in 1,2-Stellung im Cycloheptenring. Eine massive Veränderung in diesem Substituenten (mehrere O-Funktionen, Spaltung) hätte sich wohl in einer starken Verschiebung des Rf-Wertes geäussert. Da dieser im Vergleich zu Metabolit I nur sehr geringfügig erniedrigt ist, dürfte es sich bei Metabolit II am wahrscheinlichsten wie bei Metabolit I um eine im 7-Ring oxydierte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure

handeln. Der Unterschied dürfte in Stellung und Art der Sauerstoff-Funktion gedacht werden. In Frage kommen am ehesten das stellungsisomere konjugierte Keton oder eine Cycloheptenol-äthyl-barbitursäure. Diese Produkte wären auch aus der Erfahrung mit metabolischen Detoxikationsreaktionen von Barbituraten zu erwarten.

4. Metaboliten III und IV

Im Gegensatz zu den beiden Hauptmetaboliten werden die Metaboliten III und IV nur im Ausmasse von wenigen Prozenten gebildet. Auf ihre nähere Untersuchung wurde daher verzichtet.

Metabolit IV konnte als nicht unbeträchtlicher Bestandteil der mit der Galle transportierten Metaboliten nachgewiesen werden. Ein Teil erscheint in den Faeces wieder, ein anderer dürfte zur Rückresorption im Darm und nachfolgender renaler Ausscheidung gelangen. Seine Anwesenheit im wässrigen Faecesextrakt, sowie auch sein tiefer Rf-Wert (0,3) lassen auf ein wasserlösliches Produkt schliessen. Ein Paarungsprodukt wäre denkbar, doch bestehen dafür keine Anhaltspunkte.

Für beide Metaboliten kämen ferner desäthylierte Barbiturate oder andere Bruchstücke in Frage, wie sie bei einigen Barbiturat-Hynotica gefunden wurden (siehe I). Harnstoff kommt für die beiden radiochromatographisch nachgewiesenen Metaboliten III und IV nicht in Frage, da dieser ohne ^{14}C -Atom wäre. Seine geringfügige Bildung und Ausscheidung ist jedoch durchaus möglich.

B. Experimentelles

Papierchromatographie: 50–200 γ Substanz wurde in Form von 0,01 bis 0,04 ml Lösung bei Verwendung von Schleicher-Schüll-Papier 2043 b gl. auf den Startpunkt aufgetropft. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von 5 V Isopropanol, 2 V Chloroform, 3 V Ammoniak ges. Die Chromatogramme wurden 24 h lang aufsteigend entwickelt (Laufstrecke ca. 35 cm). Zur Sichtbarmachung der Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure, sowie der Metaboliten I und II und anderer ungesättigter Verbindungen, wurden die getrockneten Papierchromatogramme während 15 sec durch 0,1 %ige wässrige KMnO_4 -Lösung gezogen und im fließenden Wasser sofort bis zum Verschwinden der roten Farbe ausgewaschen. Auf diese Weise erhält man deutliche braune spots, während sich die in der Literatur empfohlenen „Barbituratreagenzien“ meist als unzuverlässig erwiesen. – Die angegebenen Rf-Werte sind Durchschnittswerte, da die einzelnen Bestimmungen Abweichungen zeigen. Konstant ist jedoch die gegenseitige Lage der spezifischen spots.

Die Radiochromatogramme wurden auf gleiche Weise entwickelt und nach dem Trocknen in 3–10 mm breite Rf-Streifen geschnitten. Diese letzteren wurden auf saubere Kupferplättchen aufgeklebt und gelangten auf einer automatischen Zählapparatur (Sample Changer der Tracerlab Inc., Boston) zur Aktivitätsbestimmung.

Gewinnung von Metabolit I bei Hunden

Die Applikation des Hypnoticums erfolgte in Gelatinekapseln, welche mit Hilfe einer speziellen Schlundsonde eingeführt wurden. Die Dosen betragen 0,25–0,70 gr Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure.

Der im Stoffwechselkäfig gesammelte Harn wird filtriert und mit verdünnter HCl angesäuert. Je tiefer der pH-Wert gesetzt wird, desto mehr Harnbestandteile werden durch die nachfolgende Ätherextraktion erfasst. Stark saurer Harn (pH 2–4) liefert gelbbraunen Extrakt, der beim Chromatographieren mehrere zusätzliche KMnO_4 -spots zeigt (R_f ca. 0,6; 0,5; 0,25). Dieselben spots finden sich auch beim Chromatographieren von normalem Harn ohne vorherige Verabreichung von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure. Es handelt sich also um normale Harnbestandteile. Die für die Extraktion optimale Acidität dürfte bei pH 4–6 liegen. Die Ätherextraktion wurde während 24 h im Extraktionsapparat nach Kutscher und Steudel ausgeführt. Beim Eindampfen des Äthers bleibt als Extrakt eine übelriechende, braune Masse zurück, die mit verdünnter Sodalösung quantitativ gelöst werden kann. Die filtrierte Lösung wird mit HCl wiederum auf pH 4–6 gestellt und anschliessend mehrmals im Scheidetrichter mit Äther extrahiert. Die braunen, mit Na_2SO_4 getrockneten Ätherphasen werden bis zur beginnenden Ausfällung vorsichtig eingeengt und die Auskristallisation in der Kälte vervollständigt. In der Regel können aus der Mutterlauge eine bis zwei weitere Fraktionen gewonnen werden. Der rohe Metabolit I wird, wenn nötig, mit Tierkohle entfärbt, und anschliessend aus Wasser umkristallisiert. – Bei der Isolierung aus Menschenharn fallen meist einige Vorfraktionen von Hippursäure an.

Derivate von Metabolit I

Die Acetylierung wurde nach einer Vorschrift von *Maynert*⁴³ mit Essigsäureanhydrid bei 100°C durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurde mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin bei Raumtemperatur gearbeitet.

Das Semicarbazon wurde erhalten durch Behandeln von 200 mg Metabolit I in 1 ml Äthanol 96 %ig mit 200 mg Semicarbazid-hydrochlorid + 300 mg Na-Acetat in 2 ml Äthanol 25 %ig. Die Reaktion benötigte einige Zeit und führte zu Ausbeuten von 35 und 50 % (Cycloheptanon unter denselben Bedingungen 72 %). Das Semicarbazon wurde aus Äthanol-Wasser umkristallisiert.

Die Oxydationsversuche von Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure mit Chromtrioxyd wurden ebenfalls nach Angaben von *Maynert*⁴³ durchgeführt. 0,75 gr des Hypnoticums wurden in 40 ml Eisessig 30 min. bei Raumtemperatur mit 4,0 resp. 1,0 gr. CrO_3 behandelt und das Reaktionsprodukt mit Äther extrahiert. Während im Falle von Amytal die Isoamyl-Seitenkette zum 3-hydroxyisoamyl oxydiert wurde⁴³, erlitt der labilere Cycloheptenyl-Ring oxydativen Abbau, vermutlich an der Doppelbindung. Es konnte weder Ausgangsmaterial noch Oxydationsprodukt isoliert werden. – Die schonen-

dere und spezifischere Oxydationsmethode mit Selendioxyd wurde nach Literaturangaben^{85,86} unter Verwendung mehrerer Lösungsmittel und gesteigerten Mengen Oxydationsmittel versucht. Je 1,0 gr Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wurde mehrere Stunden bei Siedetemperatur mit 0,10 bis 0,45 gr SeO_2 behandelt. Als Solventien dienten Äthanol, Dioxan, Xylol und Eisessig.

Isotopenverdünnungs-Versuche

Zur Herstellung von ^{14}C -signiertem Metabolit I wurde ca. 1 gr unsignierte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure an einen Hund verfüttert. Der gewonnene Harn wurde mit dem Harn einer Ratte versetzt, der ca. 20 gr ^{14}C -signierte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure (mit ca. 10^7 c/min) appliziert worden war. Der gut vermischte Gesamtharn wurde bei pH 4–6 mit Äther extrahiert und der Metabolit I, wie oben beschrieben, isoliert. Er wurde bis zur Konstanz der spezifischen Aktivität umkristallisiert und das reine Produkt in einer bestimmten Menge 10 %igem Äthanol gelöst.

Zur quantitativen Bestimmung der Ausscheidung von Metabolit I mit Hilfe der Isotopenverdünnung wurde eine bestimmte Menge unsignierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure (Hund 0,800 gr, Mensch 0,400 gr) appliziert und der Harn quantitativ aufgefangen. Nach Zusatz einer bestimmten Menge des reinen radioaktiven Metaboliten I (obige Lösung, ca. 10^6 c/min) zum Harn wurde der Metabolit I wie üblich isoliert und bis zu konstanter spezifischer Aktivität umkristallisiert.

Kontinuierliche Verteilung (Craig)

Das Lösungsmittel wurde nach folgendem Ansatz hergestellt:

3,0 lt Chloroform purissimum

7,5 lt Isopropanol dest.

4,5 lt Ammoniak-Lösung frisch gesättigt (0,88 gr/cm³ entspr. 35 %)

7,5 lt H_2O dest.

Das Gemisch wurde 50 h bei 20°C gerührt. Es entstanden ca. 15 lt Oberphase und 7 lt Unterphase. Erstere enthielt vor allem wässrigen Ammoniak, letztere zeigte Anreicherung der organischen Solventien. Beide Phasen waren rasch und klar zu trennen.

Die Verteilungsoperation wurde vorgenommen auf einer vollautomatischen 200-stufigen Apparatur in einem auf 20°C konstant gehaltenen Raume. Nach der Füllung aller Verteilungselemente mit Unterphase wurde das in Oberphase gelöste Metabolitengemisch in die ersten zehn Elemente gebracht und unter dauerndem Zufluss von Oberphase über die 200 Stufen wandern gelassen. Die Automatik wurde auf 44 Schüttelbewegungen und 5 min. Ruhezeit zur Phasentrennung eingestellt. Durch die anschliessende Kipp-Bewegung gelangte die Oberphase jedes Verteilungselementes in den Überlauf und in das nächstfolgende Element. Das letzte (Nr. 200) war mit einem synchron laufenden „fraction collector“ verbunden, wo die Fraktionen einzeln gesammelt wurden.

Zusammenfassung

1. Es werden die vorliegenden Kenntnisse über den Stoffwechsel von Barbituraten übersichtlich dargestellt.
2. Eine Synthese von 5- ^{14}C -signierter 5,5-Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wird angegeben.
3. Bei oraler Verabreichung signierter Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure an Ratten konnten nach 15 h ca. 95 % der Radioaktivität wieder aufgefunden werden und zwar 83 % im Harn, 2 % in den Faeces, 8 % im Darminhalt und ca. 1 % in Leber, Niere, Intestinaltractus, Gehirn-Rückenmark, wobei $\frac{3}{4}$ auf die Lipidfraktionen entfiel. Im Carcass sowie in der Expirationskohlendioxid konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.
4. Nach 10 Tagen betrug der Aktivitätsanteil für den Darminhalt 2 %, wogegen mit den Faeces schon nach 30 h ca. 6 % eliminiert wurden. Die Aktivität in den Organen war auf 0,25 % abgesunken. Eine Retention des Pharmakons konnte nicht festgestellt werden.
5. Die biologische Halbwertszeit wurde zu 6–8 h ermittelt. Nach 15 h ist die renale Ausscheidung (80–90 %) praktisch beendet.
6. Versuche an einer Gallenfistelratte ergaben, dass 19 % der applizierten Radioaktivität in der abgeleiteten Galle vorlagen; 77,5 % in Harn und Faeces. Die Galle war während 9 h aktiv.
7. Im Harn von Ratten traten radiochromatographisch nachweisbar 4 Metaboliten auf. Ihre Verteilung, nach sinkendem Rf-Wert dargestellt, ermittelt sich zu: I = 52,5 %, II = 32 %, III = 5 %, IV = 4 %. Unveränderte Cycloheptenyl-äthyl-barbitursäure wird nicht ausgeschieden.
8. Metabolit I ist in Bestätigung der Befunde von R. Pulver⁴¹ Cycloheptenonyl-äthyl-barbitursäure. Quantitative Bestimmung im Harn mit Hilfe der Isotopenverdünnungsmethode lieferte beim Hund 43–47 %.
9. Isotopenverdünnungsversuche am Menschen ergaben 15–30 % Metabolit I in 24 h. Die Ausscheidung verläuft langsamer als bei der Ratte.
10. Metabolit II zeigt grösste Ähnlichkeit mit Metabolit I. Es dürfte sich ebenfalls um eine im 7-Ring oxydierte Barbitursäure handeln. Deren mögliche Isolierung mit Hilfe einer Craig-Verteilung wird beschrieben.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) *E. Fischer, J. v. Mering*: Therap. d. Gegenw. 44, 97 (1903)
- (2) *E. Impens*: Deut. med. Wochschr. 38, 945 (1912)
- (3) *E. Impens*: Med. Klin. 21, 670 (1925)
- (4) *F. Grote*: Schweiz. med. Wochschr. 72, 1333 (1942)
- (5) *E. Fischer, J. v. Mering*: Therap. d. Gegenw. 45, 145 (1904)
- (6) *L. R. Goldbaum*: Anal. Chem. 24, 1604 (1952)
- (7) *P. M. Broughton*: Biochem. J. 63, 364 (1956)
- (8) *H. B. van Dyke, J. V. Scudi, D. L. Tabern*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 90, 364 (1947)
- (9) *E. W. Maynert, H. B. van Dyke*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 174 (1950)
- (10) *E. W. Maynert, J. M. Dawson*: J. Biol. Chem. 195, 389 (1952)
- (11) *E. W. Maynert, H. B. van Dyke*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 22 (1950)
- (12) *E. W. Maynert, H. B. van Dyke*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 184 (1950)
- (13) *L. J. Roth, E. Leifer, J. R. Hogness, W. H. Langham*: J. Biol. Chem. 178, 963 (1949)
- (14) *J. B. Kahn*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 98, 16 (1950)
- (15) *E. Titus, H. Weiss*: J. Biol. Chem. 214, 807 (1955)
- (16) *S. Goldschmidt, R. Wehr*: Z. Physiol. Chem. 308, 9 (1957)
- (17) *A. Wickeström, B. Salvesen*: J. Pharm. and Pharmacol. 4, 98 (1952)
- (18) *L. G. Allgén*: Acta Chem. Scand. 8, 1101 (1954)
- (19) *G. Hübner, E. Pfeil*: Z. Physiol. Chem. 296, 225 (1954)
- (20) *C. Riebeling, H. Burmeister*: Klin. Wschr. 32, 1057 (1954) ref. in Chem. Abstr. 49, 1855 (1955)
- (21) *J. T. Wright*: J. Clin. Pathol. 7, 61 (1954)
- (22) *C. Stainier, C. Lapière, S. de Tiège-Robinel*: Ann. pharm. franc. 14, 384 (1956)
- (23) *J. Bäumlner*: Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 48, 135 (1957)
- (23a) *J. Schmidlin-Mészáros*: Chimia 12, 275 (1958)
- (24) *E. Pfeil, H. J. Goldbach*: Z. Physiol. Chem. 302, 263 (1955)
- (25) *J. Raventós*: Brit. J. Pharmacol. 1, 210 (1946)
ref. in Chem. Abstr. 41, 1269 (1947)
- (26) *L. C. Craig*: J. Biol. Chem. 155, 519 (1944)
- (27) *E. W. Maynert, L. Losin*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 115, 275 (1955)
- (28) *W. D. Winters, E. Spector, D. P. Wallach, F. E. Shideman*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 114, 343 (1955)
- (29) *B. B. Brodie, J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein, E. M. Papper*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 109, 26 (1953)
- (30) *S. Goldschmidt, W. Lamprecht, E. Helmreich*: Z. Physiol. Chem. 292, 125 (1953)
- (31) *L. R. Goldbaum, P. K. Smith*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 111, 197 (1954)
- (32) *K. Bernhard, G. Brubacher, A. H. Lutz*: Helv. 37, 1839 (1954)
- (33) *K. Bernhard, M. Just, J. P. Vuilleumier, G. Brubacher*: Helv. 39, 596 (1956)
- (34) *E. W. Maynert, H. B. van Dyke*: Pharmacol. Rev. 1, 217-243 (1949)
- (35) *J. Raventós*: J. Pharm. and Pharmacol. 6 217-235 (1954)

- (36) *T. C. Butler*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 100, 219 (1950)
- (37) *B. B. Brodie, E. Bernstein, L. C. Mark*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 105, 421 (1952)
- (38) *J. Halberkann, F. Reiche*: *Münch. Med. Wschr.* 74, 1450 (1927)
- (39) *F. Fretwurst, J. Halberkann, F. Reiche*: *Münch. Med. Wschr.* 79, 1429 (1932)
- (40) *M. T. Bush, T. C. Butler, H. L. Dickison*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 108, 104 (1953)
- (41) *R. Pulver*: *Schweiz. med. Wochschr.* 73, 124 (1943)
- (42) *E. W. Maynert, H. B. van Dyke*: *Science*, 110, 661 (1949)
- (43) *E. W. Maynert*: *J. Biol. Chem.* 195, 397 (1952)
- (44) *E. W. Maynert*: *J. Biol. Chem.* 195, 403 (1952)
- (45) *B. B. Brodie, L. C. Mark, E. M. Papper, P. A. Lief, E. Bernstein, E. A. Rovensine*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 98, 85 (1950)
- (46) *J. R. Cooper, B. B. Brodie*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 110, 12 (1954)
- (47) *J. R. Cooper, J. Axelrod, B. B. Brodie*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 112, 55 (1954)
- (48) *J. R. Cooper, B. B. Brodie*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 114, 409 (1955)
- (49) *B. B. Brodie, J. Axelrod, J. R. Cooper, L. Gaudette, B. N. La Du, C. Mitoma, S. Udenfried*: *Science* (121, 603) (1955)
- (50) *B. B. Brodie*: *J. Pharm. and Pharmacol.* 8, 1 (1956)
- (51) *T. C. Butler*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 116, 326 (1956)
- (52) *J. D. Taylor, R. K. Richards, D. L. Tabern*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 104, 93 (1952)
- (53) *A. B. Ainly*: *N. Y. State J. Med.* 57, 1599 (1957)
- (54) *A. B. Ainly, G. Kaligman*: *J. Nervous Mental Disease*, 123, 125 (1956)
- (55) *B. E. Aisslinger*: *Therap. Umschau* 3, 89 (1946)
- (56) *H. G. Bauer, H. K. Reckendorf*: *N. Y. State J. Med.* 56, 3715 (1956)
- (57) *N. Béno*: *Praxis* 37, 814 (1949)
- (58) *J. Bilweis*: *Semaine médic.* 33, 339 (1957)
- (59) *D. D. Brusca*: *J. Nervous Mental Disease*, 121, 67 (1955)
- (60) *R. Fritzsche*: *Praxis* 31, 740 (1942)
- (61) *W. Halbeisen, C. M. Gruber jr., C. M. Gruber*: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 93, 101 (1948)
- (62) *W. A. Halbeisen, C. M. Gruber*: *Anesthesiology* 10, 585 (1949)
- (63) *W. A. Halbeisen, C. M. Gruber jr., C. M. Gruber*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68, 343 (1948)
- (64) *G. Hebert, N. Renzi*: *Un. méd. Canada* 85, 1422 (1956)
- (65) *T. Koppányi, C. F. Morgan*: *J. Am. Pharm. Assoc.* 44, 221 (1955)
- (66) *E. Kricke*: *Arzneimittel-Forsch.* 5, 27 (1955)
- (67) *G. A. Lienert*: *Medizinische* 45, 1608 (1956)
- (68) *S. Mutrux*: *Praxis* 35, 237 (1946)
- (69) *T. Rust*: *Praxis* 34, 19 (1945)
- (70) *J. Sangowicz, J. Gauthier*: *Un. méd. Canada* 85, 1170 (1956)
- (71) *E. Steininger*: *Prakt. Arzt* 7, 224 (1953)
- (72) *L. Ujszaszy*: *Therap. Umsch.* 5, 76 (1948)
- (73) *K. Weithaler, G. Biedermann*: *Med. Klin.* 50, 2155 (1955)
- (74) *P. Zuercher*: *Praxis* 35, 369 (1946)
- (75) *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, Bd. 24, p. 467
- (76) *J. R. Geigy A. G.*, *Brit. Pat.* 549'106 (6. Nov. 1942) ref. in *Chem. Abstr.* 38, 1077 (1944)
- (77) *A. C. Cope*: *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2327 (1937)

- (78) *A. C. Cope, C. M. Hofmann, C. Wyckhoff, E. Hardenbergh: J. Am. Chem. Soc. 63, 3452 (1941)*
- (79) *Organic Syntheses 31, 25 (1951)*
- (80) *S. Dev: J. Indian Chem. Soc. 30, 443 (1953)*
- (81) *S. Dev: J. Indian Chem. Soc. 30, 665 (1953)*
- (82) *K. Bernhard, M. Just, J. P. Vuilleumier: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, 15, 177 (1957)*
- (83) *K. Bernhard, G. Ritzel: Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 11, 166 (1953)*
- (84) *R. Deininger: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 227, 316 (1956)*
- (85) *N. Rabjohn: Org. React. V, 331-386 (1949)*
- (86) *Organic Syntheses 32, 35 (1952)*
- (87) *E. Spector, F. E. Shideman: J. Pharmacol. Exp. Therap. 122, 71 A (1958)*

Curriculum vitae

Am 14. Oktober 1927 wurde ich, Marcel Henry Bickel, als Sohn des Moritz, Chemiker von Adliswil (ZH), und der Marguerite Bickel-Sigerist in Basel geboren.

Ich besuchte daselbst die Primärschule und während zwei Jahren das Realgymnasium. Nach einem halben Jahr im Institut Briner in Flims (GR) durchlief ich in Basel die dritte bis achte Klasse des Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasiums. Nach meinem Austritt und kurzen Fabrik-Volontariaten in Basel und Zürich studierte ich 1947 bis 1950 Chemie am Technikum Winterthur, wo ich das Diplom als Technikumschemiker erwarb. Als solcher arbeitete ich während zwei Jahren in je einem textilchemischen Unternehmen in der Schweiz, Deutschland und Grossbritannien.

1954 legte ich die Eidgenössische Maturität (Typus B) ab, nachdem ich schon 1952 meine Studien an der Universität Basel aufgenommen hatte. Ich wählte dabei Chemie als Hauptfach, physikalische Chemie, Physik und Philosophie als Nebenfächer. Vorlesungen, Seminarübungen und Praktika besucht ich bei folgenden Herren Dozenten:

Heinrich Barth, K. Bernhard, G. Blin, M. Brenner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, M. Fierz, J. Gantner, C. A. Grob, Gerhard Huber, Paul Huber, K. Jaspers, W. Kuhn, G. P. Landmann, E. Miescher, A. Portmann, T. Reichstein, T. Reinhard, A. Rothlin, C. Tamm, R. Wizinger und G. Zamboni.

Meine 1956 begonnene Dissertation entstand unter der Leitung von Prof. Dr. Karl Bernhard am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel. Seit 1958 bin ich an diesem Institut als Assistent tätig.

